



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**VÝVOJ METODY PRO STANOVENÍ ANTIBIOTIK V MLÉCE
POMOCÍ VYSOKOÚČINNÉ KAPALINOVÉ
CHROMATOGRAFIE**

DEVELOPMENT OF A METHOD FOR DETERMINATION OF ANTIBIOTICS IN MILK USING HIGH
PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Zuzana Juglová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D.

BRNO 2020

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1434/2019 Akademický rok: 2019/20
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Zuzana Juglová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Vývoj metody pro stanovení antibiotik v mléce pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie

Zadání diplomové práce:

1. Vypracování teoretické části práce
2. Validace metody HPLC pro stanovení tetracyklinových antibiotik v mléce po extrakci technikou DGT
3. Zpracování naměřených výsledků, diskuse výsledků práce

Termín odevzdání diplomové práce: 29.5.2020:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Zuzana Juglová
student(ka)

doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá optimalizací a validací metody pro stanovení tetracyklinových antibiotik (oxytetracyklin a tetracyklin) pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s detektorem diodového pole (HPLC-DAD). Cílem práce bylo vytvořit robustní metodu pro stanovení těchto antibiotik v mléku po extrakci technikou DGT. Teoretická část práce se zabývá jednotlivými skupinami antibiotik a jejich mechanismem účinku, možnostmi využití a možným vznikem rezistence. Následně je rozebrána legislativa, která ošetřuje povolené množství antibiotik v mléce. Detailně je popsána metoda HPLC a jednotlivé validační parametry. Experimentální část je zaměřena na vytvoření metody, její optimalizaci a validaci. V rámci validace byly ověřeny tyto parametry: volba mobilní a stacionární fáze, vlnová délka DAD, linearita, přesnost metody, mez detekce a kvantifikace, robustnost. Jako nejvhodnější mobilní fáze byla vyhodnocena směs 0,01 M kyseliny trifluoroctové, methanolu a acetonitrilu v poměru 80:10:10. Jako optimální vlnová délka pro detekci tetracyklinových antibiotik byla zvolena 355 nm. Při stanovení robustnosti metody se prokázalo, že metoda je robustní, statisticky významný vliv na robustnost byl zjištěn pouze při použití rozdílné stacionární fáze.

KLÍČOVÁ SLOVA

tetracyklinová antibiotika, oxytetracyklin, tetracyklin validace metody, HPLC-DAD

ABSTRACT

This diploma thesis focuses on optimization and validation of the method for a mixture of tetracycline antibiotics (oxytetracycline, tetracycline) determination using high performance liquid chromatography with a diode array detector (HPLC–DAD). The aim of this thesis was to determine suitability of the system for the determination of these antibiotics in milk. The theoretical part is focused on individual groups of antibiotics and their mechanism of action, resistances and possibilities of use. Next point of this thesis is legislation, which describes permitted amounts of antibiotics in milk. In this study, the HPLC method and validation parameter is described in detail. The experimental part deals with creation and optimization of the method and its validation. Following validation parameters were verified: system suitability, linearity, method accuracy, limit of detection and quantification, robustness. The results obtained indicate mostly suitable ratio of mobile phase of 0,01 M trifluoroacetic acid:methanol:acetonitrile = 80:10:10. The wavelength 355 nm was found as the most feasible for this method after evaluating the result. Determination of robustness showed that the method is robust, and the only significant effect on the robustness was observed in column changes.

KEYWORDS

Tetracycline antibiotics, oxytetracycline, tetracycline, method validation, HPLC-DAD

JUGLOVÁ, Zuzana. Vývoj metody pro stanovení antibiotik v mléce pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Brno, 2020. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/124019>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Pavel Diviš.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

DECLARATION

I declare that the bachelor thesis has been worked out by myself and that all the quotations from the used literary sources are accurate and complete. The content of the bachelor thesis is the property of the Faculty of Chemistry of Brno University of Technology and all commercial uses are allowed only if approved by both the supervisor and the dean of the Faculty of Chemistry, BUT.

.....
student's signature

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu práce doc. Ing. Pavlu Divišovi, Ph.D. a konzultantce Ing. Lence Punčochářové za cenné rady, odbornou pomoc a čas, který mi věnovali v průběhu tvorby diplomové práce.

OBSAH

1	Úvod	10
2	Teoretická část	11
2.1	Antibiotika	11
2.1.1	Historie	11
2.1.2	Rozdělení antibiotik	13
2.2	Mastitida	22
2.3	Legislativa.....	23
2.4	Vysoko-účinná kapalinová chromatografie	24
2.4.1	Historie	24
2.4.2	Kapalinový chromatograf.....	25
2.5	Vývoj a validace metody HPLC	31
2.5.1	Optimalizace v rámci validace metody	32
2.5.2	Přesnost metody	34
2.5.3	Linearita a rozsah	35
2.5.4	Limit detekce a kvantifikace	35
2.5.5	Selektivita a specifita.....	36
2.5.6	Správnost metody	36
2.5.7	Robustnost	36
3	Experimentální část	39
3.1	Používané přístroje a laboratorní vybavení	39
3.2	Chemikálie	39
3.3	Metoda pro stanovení oxytetracyklinu a tetracyklinu pomocí HPLC	39
3.3.1	Nastavení přístroje	39
3.3.2	Výběr kolony	40
3.4	Příprava roztoků standardů	40
3.4.1	Příprava zásobního roztoku	40
3.4.2	Stanovení linearity	40
3.4.3	Stanovení limitu kvantifikace a detekce.....	41
3.4.4	Stanovení robustnosti metody.....	41
4	Výsledky a diskuse.....	42
4.1	Optimalizace složení mobilní fáze	42
4.2	Charakterizace sledovaných standardů.....	44
4.3	Výběr vhodné vlnové délky pro detekci.....	45
4.4	Validace metody.....	46

	4.4.1 Optimalizace v rámci validace metody	46
	4.4.2 Přesnost metody (precision)	48
	4.4.3 Linearita.....	48
	4.4.4 Mez detekce a kvantifikace	49
	4.4.5 Robustnost	50
5	Závěr.....	59
6	Reference	60
7	Seznam použitých zkratk a symbolů	66

1 ÚVOD

Nejvýznamnější objev v historii antibiotik učinil Alexandr Fleming, který objevil doposud neznámou látku, a to penicilin. Tento krok odstartoval velkou éru antibiotik, ve které jsou objevována stále nová antibiotika. V současné době si bez antibiotik nedokážeme představit život a využíváme je k léčbě bakteriálních onemocnění jak lidí, tak zvířat. Bohužel jejich nadměrné užívání antibiotik může vést ke vzniku rezistence mikroorganismů k těmto látkám, na kterou upozorňoval již Fleming.

Antibiotika lze dělit podle různých kritérií. Nejpoužívanější je dělení antibiotik podle chemické struktury. Objev β -laktamových antibiotik patří mezi největší úspěch od dob Fleminga. Skupina β -laktamových antibiotik představuje více jak 65 % světového trhu s antibiotiky. Aminoglykosidová antibiotika mají hlavní výhodu v jejich širokém bakteriálním spektru a vícestupňovém účinku na bakterie. Makrolidová antibiotika jsou v praxi využívána antibiotika proti infekcím dýchacích cest, kůže a měkkých tkání. Linkosamidy se využívají ve veterinární dermatologii, jelikož dobře pronikají do infikované pokožky. Polypeptidová antibiotika byla objevena nedávno. Přírodní peptidy jsou produkovány všemi druhy života jako hlavní součást obranných molekul proti mikroorganismům v prostředí. Mezi skupinu tetracyklinu řadíme oxytetracyklin a tetracyklin. Jejich základní strukturou jsou čtyři aromatické kruhy. V současné době je předepisování farmak na bázi tetracyklinu omezené kvůli nežádoucím účinkům a vzrůstající rezistenci mikroorganismů. Avšak ve veterinární medicíně jsou to nejpoužívanější antibiotika. Hlavními využitím je při respiračních a kožních infekcích, či zánětech močových cest. U přežvýkavců se využívají ve velké míře při léčbě mastitidy.

Mastitida je nejběžnější onemocnění krav v mlékárenském průmyslu. Během léčby tohoto onemocnění je mléko znehodnoceno antibiotiky, které jsou využívány na léčbu. Z mikrobiálního hlediska je též nepřipustné. Tetracykliny jsou z antibiotik nejpoužívanějšími na léčbu mastitidy. Avšak léčení antibiotiky může způsobit, že se v mléce nebo mléčných výrobcích objeví rezidua antibiotik. Antibiotika v mléce představují problém nejenom z hlediska zdravotního, ale také způsobují problémy při výrobě mléčných produktů. Maximální množství oxytetracyklinu a tetracyklinu v mléce je 100 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ dle nařízení komise EU č. 37/2010 ze dne 22. prosince 2009.

Tato diplomová práce se věnuje vytvoření a validaci metody pro stanovení oxytetracyklinu a tetracyklinu v mléku pomocí HPLC-DAD po extrakci technikou DGT.

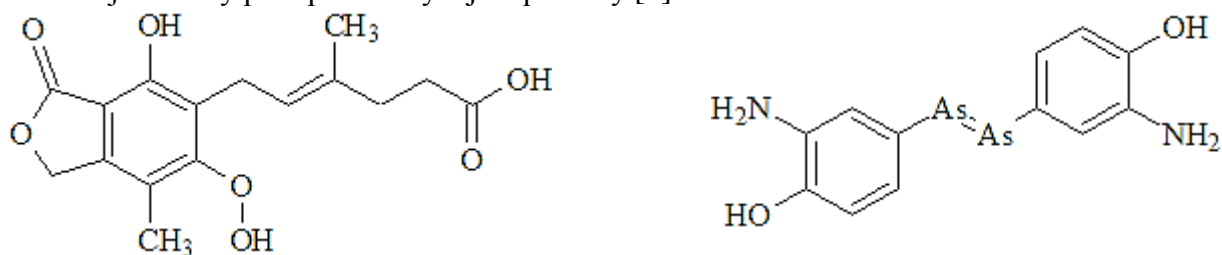
2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Antibiotika

2.1.1 Historie

První antibiotikum, které v přírodě bylo nalezeno, byla kyselina mikofenolová (Obrázek 1). Lékař a mikrobiologem Bartolomeo Gosio tuto látku popsal jako první roku 1893 [1]. Kyselina mikofenolová byla izolována z *Penicilium glaucum* jako bílá krystalická látka a bylo zjištěno, že inhibuje růst *Bacillus anthracis*. Později byl prokázán její protivirový, protiplísňový, protinádorový účinek a efekt proti lupénce. Struktura kyseliny mikofenolové byla zcela objasněna v roce 1952 v práci J. H. Brkinshawa [2]. Německý lékař Paul Ehrlich během první desetiletí dvacátého století představil první umělé antibakteriální činidlo tzv. arsfenamin (Obrázek 1) [3].

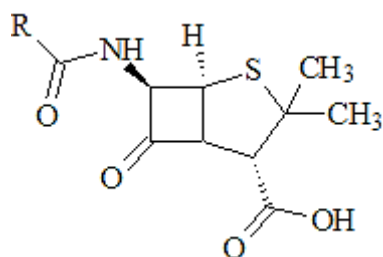
Několik měsíců po objevení se arsfenamin (neboli salvarsan) začal používat proti syfilidě a trypanozómii a byl to nejhojněji využívaný lék do roku 1940. Mechanismus účinku léku však zůstal nejasný. Ačkoliv bylo známo, že se arsfenamin přemění na aktivní formu v těle a je toxický pro spirochety a jiné parazity [4].



Obrázek 1: Kyselina mikofenolová a arsfenamin

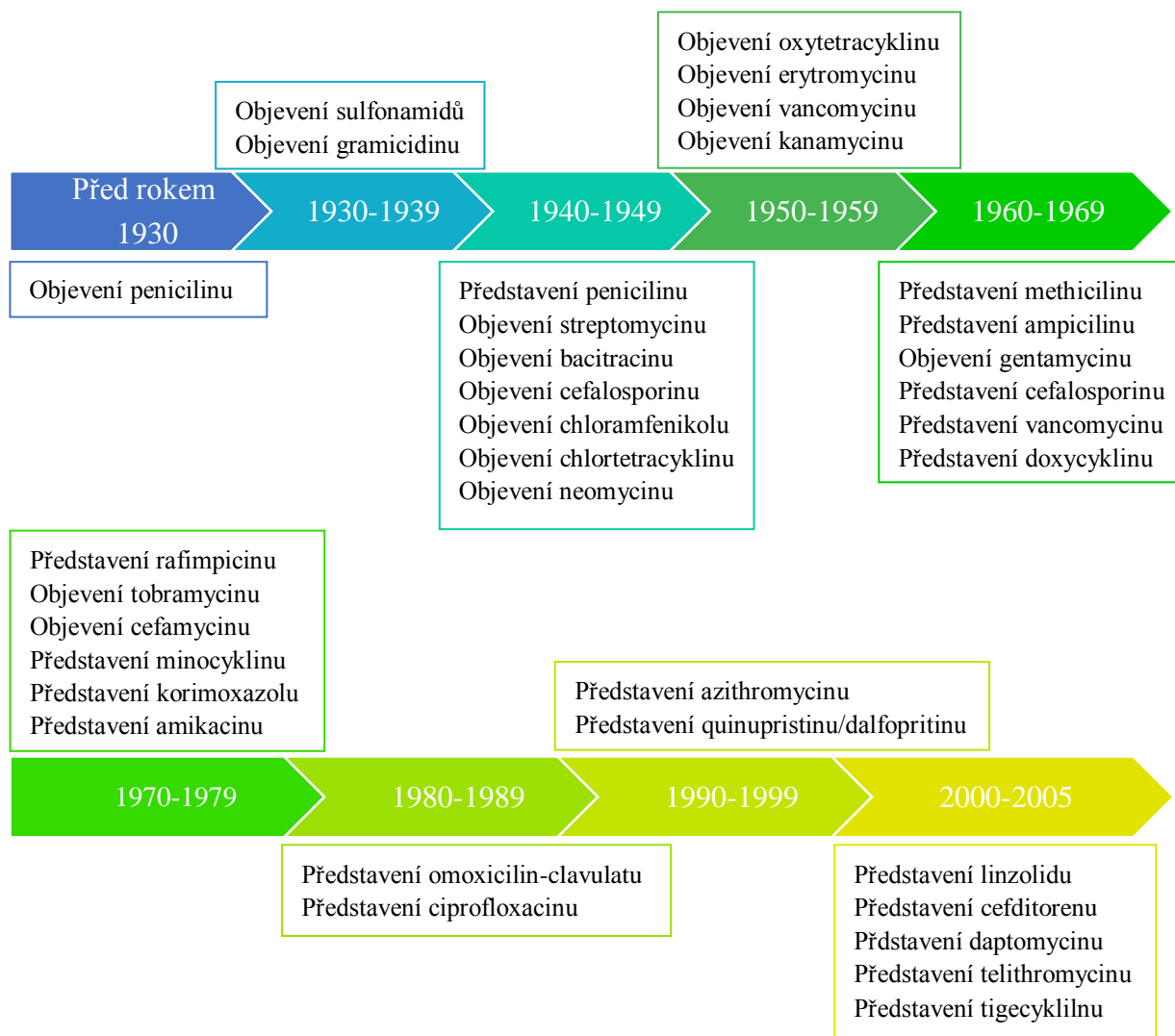
Další objevenou látkou s antimikrobiálními účinky byl sulfonamidchrysoidin objevený dvěma chemiky J. Klarerem (1898-1953) a F. Mietzchem (1896-1958). Avšak pouze díky úsilí Domagka (1895-1964) bylo představeno první sulfa-antibiotikum Prontosil v roce 1932. Prontosil sice nebyl prvním antimikrobiálním přípravkem, ale byl první, který se stal široce známým. Prontosil bylo léčivo, které bylo metabolizováno na sulfonilamid. Sulfonilamidy jsou bakteriostatická antimetabolitová léčiva, která indukují inhibici folátů [4].

V roce 1928, Alexander Fleming učinil jeden z nejvýznamnějších objevů – objevil penicilin [5]. Fleming se snažil spolupracovat s řadou vědců ve snaze izolovat neznámou látku, ale bez úspěchu. V roce 1939 začal patolog H. W. Florey s biochemiky E. Borisem a N. Heathym pracovat na izolaci záhadné látky. Po roce práce se jim podařilo látku otestovat na myších a získat fenomenální výsledky. Penicilin byl poprvé využit pro léčbu infekce obličeje způsobující sepse v roce 1941 na pacientovi Albertu Alexandrovi. V roce 1945 se penicilin stal dostupným pro veřejnost a ve stejném roce byla objasněna struktura rentgenovou krystalografickou analýzou (Obrázek 2). Což umožnilo, aby byl klasifikován jako první člen rodiny β -laktamů [3].



Obrázek 2: Penicilin

V roce 1945 bylo nasyntetizováno první antibiotikum ze třídy cephalosporinů a to cephalosporin C, který byl produkován mikroorganismem *Acremonium chrysogenum*. Mezi další důležité milníky ve vývoji antibiotik patří izolace tyrotricinu z *Bacillus brevis* popsané v práci francouzského mikrobiologa René Duboseho [6]. Později bylo prokázáno, že to byla směs gramicidinu D a tyrocidinu [3]. V dalších desetiletích se objevila celá řada jednotlivých antibiotik (Obrázek 3).



Obrázek 3: časová osa objevů antibiotik [7]

2.1.2 Rozdělení antibiotik

Antibiotika je možné dělit do skupin podle mechanismu účinku (inhibice syntézy buněčné stěny, poškození funkce cytoplazmatické membrány, poruchy syntézy buněčných bílkovin, poruchy metabolismu specifických dějů), šíře antimikrobiálního spektra (antibiotika s širokým/úzkým spektrem), podle chemické struktury (viz kapitola 2.1.2.1).

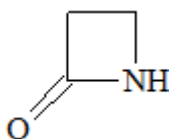
2.1.2.1 Dělení podle chemické struktury

β -laktamová antibiotika

Objev β -laktamových antibiotik patří mezi největší úspěchy moderní doby. Od Flemingova náhodného objevu penicilinu uplynulo více jak 70 let a je to stále nejúspěšnější aplikace přírodního produktu jako chemoterapeutika. Skupina β -laktamových antibiotik obsahuje více jak 50 prodáváných druhů (včetně penicilinu, cefalosporinu, karbapenu, manobaktamu atd.), což představuje více jak 65 % světového trhu s antibiotiky [8].

Tato antibiotika produkují eukaryotické houby, aktinomycety (nejčastěji *Streptomyces*) a také bakterie (role jejich in vivo produkce doposud nebyla objasněna) a velké množství β -laktamových antibiotik může být také připraveno synteticky. Jejich výhodou je nízká toxicita pro eukaryotické buňky oproti vysoké toxicitě vůči bakteriálním buňkám. Tento selektivní účinek je spjat s představou, že účinek souvisí s jedinečnou bakteriální složkou a to buněčnou stěnou [9].

Tato skupina antibiotik má baktericidní účinky, tedy působí pouze na bakterie v růstové fázi, protože inhibují syntézu buněčné stěny. Základem je navázání na protein vázající penicilin (PBP, anglicky penicilin – binding proteins). Tyto proteiny (transpeptidázy, karboxypeptidázy, endopeptidázy) jsou navázány na vnější straně buňky, na které se váží kovalentní vazbou antibiotika. Jsou zodpovědné za vzájemné propojení peptidoglykanů v buněčné stěně. Buňky s poškozenou buněčnou stěnou nejsou schopné bránit se osmotickým změnám [10]. Inhibitorem těchto antibiotik jsou β -laktamázy (např.: kyselina klavulanová) [11]. Tyto enzymy působí hydroliticky na amidovou vazbu, která je charakteristická pro čtyřčlenný β -laktamový kruh [12].

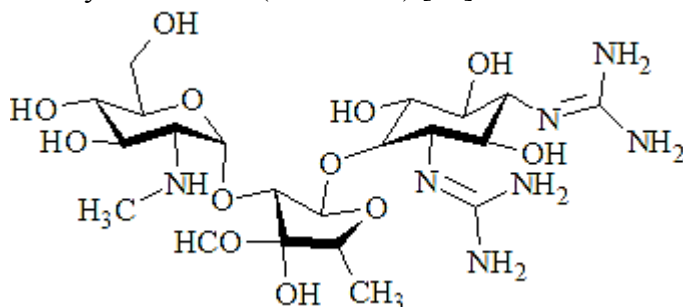


Obrázek 4: β -laktamový kruh

Aminoglykosidy

Prvním aminoglykosidovým antibiotikem byl streptomycin, který byl objeven Slemánem Waksmanem. Tato látka byla dlouho hledaným lékem na tuberkulózu a stala se široce populární na konci 40. a 50. let. Když byl streptomycin a dihydrostreptomycin použit poprvé, měla řada pacientů trvalé poškození sluchu a rovnováhy. Nefrotoxický (toxický pro ledviny) a ortotoxický (toxický pro hlavový nerv, způsobuje nedoslýchavost) potenciál streptomycinu byl popsán krátce po jeho objevení, během jeho počátečního klinického testování [13].

Všechny přírodní nebo semisyntetické aminoglykosidy mají ve své struktuře několik, většinou tři kruhy (cyklity - nasycená struktura 6-uhlíkatého kruhu) a pentózu nebo hexózu, které jsou spojené glykosidickými vazbami (Obrázek 5) [14].



Obrázek 5: Příklad struktury aminoglykosidu na streptomycinu

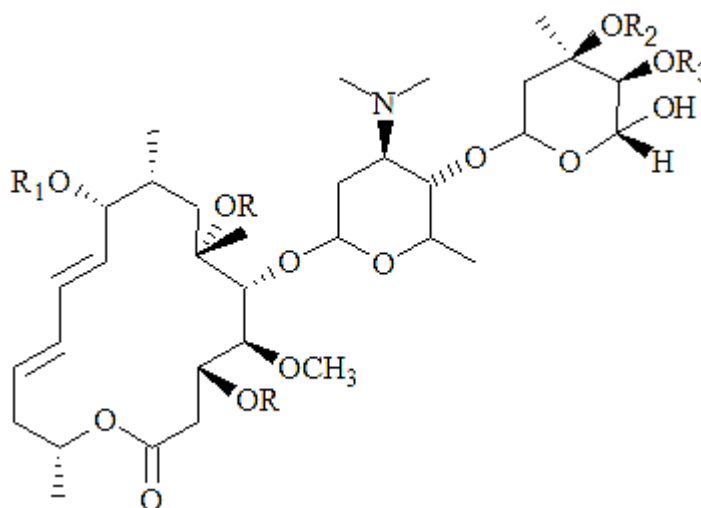
Primárně je tato skupina látek využívána pro léčbu gram-pozitivních a gram-negativních bakteriálních infekcí. Aminoglykosidy mohou být využity i v jiném kontextu. Ukázalo se, že inhibují produkci HIV-1 blokováním vazby virového regulačního proteinu Rev. Také gen pro aminoglykosidovou rezistenci je využíván jako genetická značka eukaryot a prokaryot v molekulární biologii [14].

Hlavní výhodou těchto antibiotik je široké bakteriální spektrum a baktericidní vlastnosti (tzn. jejich schopnost zabít bakterii i mimo fázi růstu). Jejich vícestupňový účinek na bakterie začíná na plazmatické membráně internalizací (přesunem molekuly z vnějšího prostředí do buňky) a končí ovlivněním různých intracelulárních procesů [13]. Klíčovým bodem působení antibiotik je vstup do buňky. To se děje vícefázovým mechanismem. První krok je nezávislý na energii. Zahrnuje počáteční průchod látek vnější membránou a periplazmatickým prostorem u gram-negativních organismů a průchodu buněčnou stěnou u gram-pozitivních bakterií. Následuje vazba kationtového aminoglykosidu na vnější stranu buněčné membrány elektrostatickými interakcemi. Druhý krok je závislý na energii. Pozitivně nabitá molekula získává vstup do cytosolu. Proteinový mediátor pro tento proces doposud nebyl objeven. Energie pro děj se získává z transmembránového potenciálu. Třetí krok je rychlý a závislý na energii. Aminoglykosid se naváže na ribozomy a dojde k akumulaci antibiotik v buňce. Velká koncentrace antibiotik má pleiotropní účinky: způsobují chybnou translaci mRNA, ztrátu integrity buněčné membrány vedoucí ke zvýšené permeabilitě a inhibici replikace DNA [14].

Stejně jako u řady jiných antibiotik vedlo rostoucí používání aminoglykosidů ke vzniku rezistentních bakterií. Prvními rezistentními bakteriemi byly kmeny *M. tuberculosis*, které byly rezistentní na streptomycin. Ve všech kmenech došlo ke změně rRNA a ribozomálních proteinů. Mechanismus rezistence může být enzymatický a neenzymatický [15].

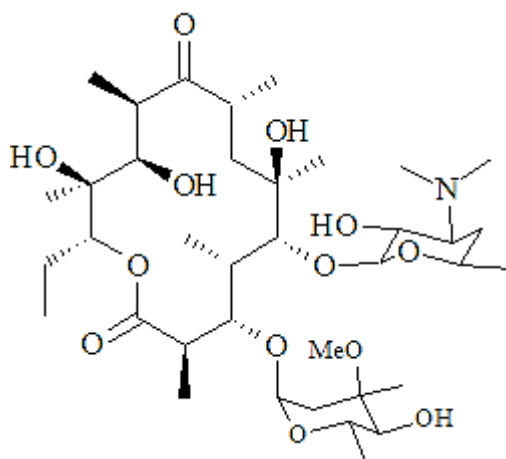
Makrolidová antibiotika

Makrolidová antibiotika mají velké využití v klinické praxi jako léčivo proti infekcím gram-pozitivních a některých gram-negativních bakterií, např.: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* a *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*. Tato antibiotika jsou využívána při léčbě infekcí dýchacích cest, kůže a měkkých tkání, a to zejména u pacientů, kteří jsou alergičtí na penicilin [16]. Struktura makrolidových antibiotik se skládá z 14-16 uhlíkatých laktonových kruhů nesoucí jeden nebo více cukerných zbytků a další substituce na laktonovém kruhu (Obrázek 6) [17].

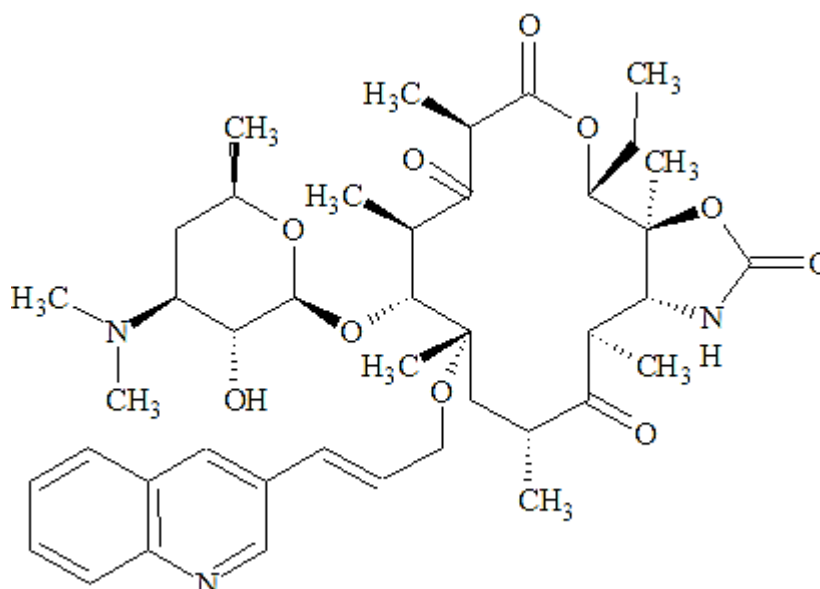


Obrázek 6: Obecná struktura makrolidového antibiotika o 16členém laktonovém kruhu

Erytromycin A, který je čtrnácti členný (Obrázek 7), byl prvním klinicky využívaným makrolidovým antibiotikem. Je to metabolit mikroorganismu *Streptomyces erythreus*. Velký problém při rozšiřování erytromycinu A představoval systém podávání léků, protože daná látka byla nestabilní v kyselém prostředí. Postupně se objevovaly nové generace antibiotik a s nimi se zvyšovala jejich stabilita v kyselém prostředí a širší spektra využitelnosti. Účinnost těchto sloučenin byla však snižována postupnou rezistencí mikroorganismů. Nejnovější skupinou makrolidových antibiotik jsou ketolidy. Ty by měly být účinnější na odolné rezistentní kmeny [17]. Makrolidová antibiotika mohou být rozdělena do 4 základních skupin podle počtu uhlíku v laktonovém kruhu. První skupinou jsou antibiotika o dvanácti uhlících, která mají ketonovou skupinu na C – 7. Do této skupiny patří např.: metymycin, neomeymycin atd. Pouze semisyntetická dvanáctiuhlíková antibiotika mají klinický účinek. Druhou skupinou jsou látky o čtrnácti uhlících v laktonovém kruhu. V této skupině nacházíme erytromycin, erythromycylamin a další [18]. Nově objevenou skupinou čtrnáctiuhlíkatých makrolidů jsou ketolidy (Obrázek 8). Hlavním rozdílem ve struktuře je přítomnost L-kladínózy a tři ketonových skupin na čtrnácti uhlíkaté kostře sloučeniny [16]. Sloučeniny o patnácti uhlících v laktonovém kruhu tvoří třetí skupinu. Řadíme sem azitromycin, který má zlepšenou aktivitu proti gramnegativním bakteriím a jehož struktura byla odvozena od erytromycinu A. Přírodní makrolidová antibiotika o šestnácti uhlících byla chemicky modifikována, aby byla zlepšena jejich účinnost proti některým rezistentním mikroorganismům. Pouze několik molekul bylo úspěšných, jako např.: miocamycin a rokitamycin [18].

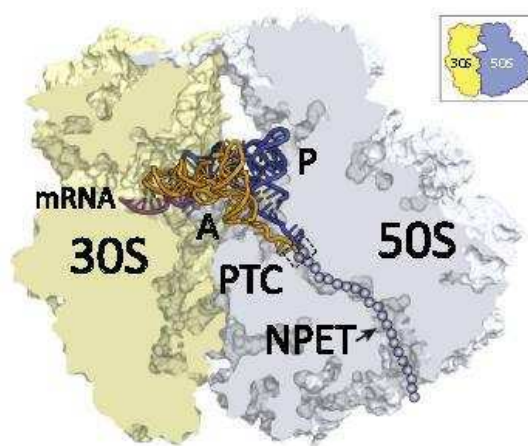


Obrázek 7: Struktura erytromycinu A [17]



Obrázek 8: Obecná struktura ketolidů [16]

Makrolidová antibiotika inhibují proteinovou syntézu zacílením na bakteriální ribozom. Látky se naváží na ribozomální exitový tunel (NPET – nescent peptide exit tunnel, Obrázek 9). NPET je cesta z ribozomu, kterou prochází syntetizovaný protein. Dříve se předpokládalo, že makrolidy zastavují translaci jednoduše vyplněním NPET, čímž zablokují tvoření nových bílkovin. Nicméně v dnešní době se předpokládá, že antibiotika umožňují průchod některým bílkovinám a mohou narušovat syntézu specifickým způsobem [18]. Kannan aspol. [19] ve své práci demonstruje, že makrolidy jsou spíše specifické inhibitory translace, jelikož některé proteiny mohou projít přes NPET přestože na ribozom působí makrolidové antibiotikum.



Obrázek 9: Struktura ribozomu [18]

Makrolidy mají málo vedlejších efektů a jsou považovány za jedny z nejbezpečnějších antimikrobiálních látek v současnosti. Zaznamenány byly alergické reakce, lokální podráždění, ototoxicita, hepatotoxicita atd. Zřídka se vyskytly psychické problémy, hemolytická anémie, astma aj. Gastrointestinální intolerance je nejčastějším vedlejším efektem a závisí na dávce antibiotika. Příznaky mohou být bolesti břicha, křeče, průjem, nadýmání, nevolnost a zvracení. Tento vedlejší efekt byl zaznamenán u 20–50 % pacientů, kteří užívali erytromycin [16].

Bakteriální rezistence na makrolidová antibiotika byla objevena roku 1956 u stafylokoků. Rezistence probíhá třemi základními mechanismy: změna cílového místa, změna transportu antibiotik, modifikace antibiotik [16].

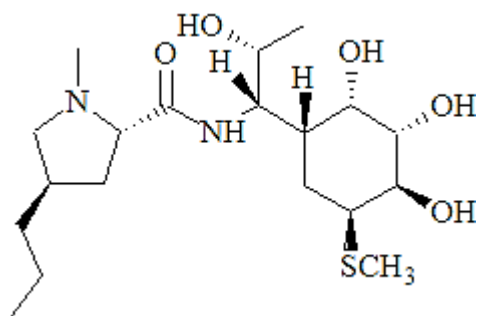
Nejběžnější mutací bakterií je změna cílového místa. Mutace přímo nebo alostericky ovlivňuje vazbu makrolidů a způsobuje rezistenci tím, že brání v navázání antibiotika na ribozom. Mutace v ribozomálních proteinových genech jsou častou příčinou rezistence na léčivo, protože k mutaci buněk vůči makrolidu stačí jedna mutační událost. Nejčastěji nalezeným mechanismem modifikace vazebného místa makrolidu je demethylace jednoho 23S rRNA nukleotidu metyltransferázami. Demethylace vazebného místa makrolidu snižuje afinitu léku, čímž činí bakterie odolné vůči vysokým koncentracím antibiotik [20].

Druhou nejčastější rezistencí je modifikace antibiotika bakteriemi. Může odcházet k esterovému štěpení makrolidového kruhu, makrolidové glykosylaci nebo makrolidové fosforylaci. Glykosylace prekurzorů hraje důležitou roli v biosyntéze makrolidů [21].

Třetí variantou je transport antibiotik ven z buňky. Transportéry můžeme rozlišit podle toho, zda jsou poháněny protonmotivní silou nebo ATP. Také se dají rozlišit podle toho, zda jsou to jednoduché přenašeče v membráně nebo proteiny přenášející více léčiv [21].

Linkosamidy

Linkosamidy jsou antibakteriální látky vycházející z přírodního produktu linkomycinu (Obrázek 10). Skupina antibiotik zahrnuje semisyntetické deriváty. V současné době jsou linkosamidy využívány k léčbě řady infekcí. Jsou účinné proti gram-pozitivním bakteriím, ale najdou využití i u některých aerobních gram-negativních bakterií a protozoí [22]. Jsou produkovány několika druhy rodu *Streptomyces* (*S. lincolnensis*, *S. spinosus*, *S. roseolus* atd.) [23].



Obrázek 10: Linkomicyn. Struktura linkosamidů je složena z aminokyseliny (kyseliny propylhygrové) a sacharidové jednotky (methylthio-linkosamid)

Linkomicyn a clindamycin (nejvýznamnější semisyntetický derivát) jsou velmi důležitá klinická antibiotika. Clindamycin se řadí mezi 20 nejužívanějších antibiotik na světě. Tato antibiotika se používají v případech, kdy se očekává působení aerobních i anaerobních bakterií (například prevence vnitrobřišní infekce po zákroku, stomatologická infekce, anaerobní sepe, infekce kostí a kloubů). Linkosamidy jsou první volbou ve veterinární dermatologii. Tyto látky jsou při perorálním podání dobře absorbovány a dobře pronikají do infikované kůže. Hlavní nevýhodou linkosamidů je rychle se rozšiřující rezistence bakterií a občasné gastrointestinální problémy [23].

Linkosamidy patří ke skupině antibiotik, která inhibují proteinovou syntézu [23].

Polypeptidy

V posledním půl století jsou polypeptidová antibiotika v rozmachu. Jejich molekulová hmotnost je menší než u proteinů, pohybuje se mezi 350 a 3000. Nemusí být složeny výhradně z aminokyselin. Mohou obsahovat hydroxykyseliny, pyrimidiny, aminy, mastné kyseliny atd. Peptidová antibiotika jsou rezistentní vůči proteázám, které jsou produkovány zvířaty a rostlinami [24]. Dělí se do dvou tříd, non-ribosomálně syntetizované proteiny (například gramicidin, polymyxin, bacitracin, glykopeptidy) a ribosomálně syntetizované (přírodní) peptidy [25].

Non-ribosomálně syntetizované proteiny obsahující dvě nebo více skupin odvozených od bílkovin jsou z velké části produkovány bakteriemi a následně modifikovány. Cylicimycin, derivát polymyxinu E je využíván proti infekci plic způsobenou bakterií *Pseudomonas aeruginosa* a je dobře snášen. Gramicidin S je poměrně toxický, jelikož dochází k lyzi erytrocytů při koncentracích jen trojnásobně vyšších, než je minimální inhibiční koncentrace pro bakterie. Proto je užíván pouze lokálně. Polymyxin B s gramicidinem S a bacitracinem jsou využívány v topických přípravcích [25].

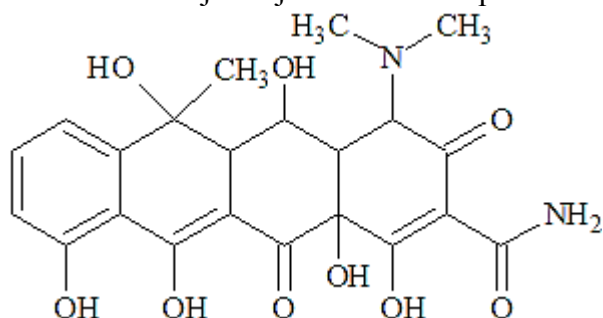
Přírodní peptidy jsou produkovány všemi druhy života (včetně bakterií) jako hlavní součást přirozených hostitelských obranných molekul. Byly objeveny poměrně nedávno jako součást vrozené imunity. Každý peptid je pak uzpůsoben tak, aby optimálně působil proti mikroorganismům v prostředí, ve kterém je produkován. Tyto látky jsou širokospektrální, mají poměrně nízkou minimální inhibiční koncentraci a působí i na patogeny, které disponují rezistencí k antibiotikům. S těmito antibiotiky teprve probíhají klinické studie [25].

Tetracykliny

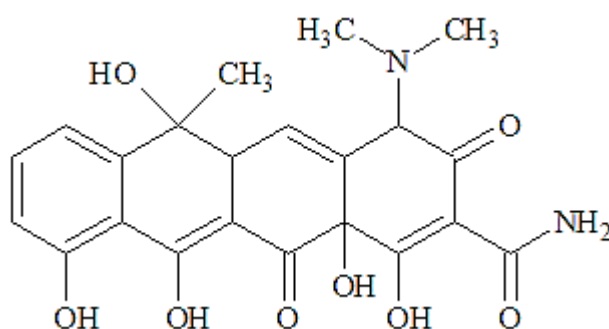
Tetracykliny byly objeveny roku 1948 Benjaminem Duggarem [26], který zjistil, že tyto látky jsou produkovány bakteriemi kmene *Streptomyces*. Prvními popsány tetracyklinovými

antibiotiky byly chlortetracyklin (CTC) a oxytetracyklin (OTC). Tyto sloučeniny jsou širokospektrální antibiotika, působí proti řadě mikrobů (G+ i G- bakterie, mykobakterie, mykoplazmata, patogenní α – proteobakterie a některá protozoa), což je činí atraktivními pro farmaceutický průmysl [[30]]. Postupem času se tato skupina tetracyklinových antibiotik rozrůstala o další antibiotika. První rezistentním mikroorganizmem na tetracyklin byla *Shigella dysenteriae*, která byla izolována v roce 1953. V roce 1955 byla izolována multi-rezistentní *Shigella*, která byla odolná vůči tetracyklinu, chloramfenikolu a streptomycinu [27]. Od té doby byla identifikována celá řada bakteriálních kmenů rezistentních vůči tetracyklinům. Determinanty rezistence lze nalézt v genomech mikroflóry zvířat a lidí, životního prostředí atd. Tyto bakterie pak mohou působit jako přenašeče genů pro rezistenci na patogenní mikroorganismy [28].

Základem struktury tetracyklinů jsou čtyři aromatické kruhy (Obrázek 11). Tetracykliny jsou málo rozpustné ve vodě, tedy jsou často dávány do kyselých nebo zásaditých solí. Tetracykliny jsou amfoterní léky a v roztocích tvoří směs kationtů a aniontů v závislosti na pH. Jsou poměrně stabilní ve fyziologickém pH s výjimkou chlortetracyklinu [29]. Dělí se do dvou skupin. Mezi první skupinu (tzv. „typické tetracykliny“) řadíme tetracyklin, doxycyklin, oxytetracyklin a mnohé další. Tato skupina má bakteriostatický účinek na úrovni tvorby bílkovin. Mezi druhou skupinu (tzv. „atypické tetracykliny“) se řadí chelokardin, anhydrotetracyklin a další antibiotika působící na cytoplasmatickou membránu. Tyto sloučeniny nejsou pro využití ve farmacii nijak zajímavé a v Evropské Unii jsou zakázané [28].



Obrázek 11: Struktura oxytetracyklinu



Obrázek 12: Struktura tetracyklinu

Tetracykliny se váží na ribozomální RNA, čímž zastaví translaci, jelikož se nemůže navázat tRNA v elongační fázi. Tetracykliny se do gram-negativních buněk dostávají nejčastěji jako hořčnaté cheláty prostou pasivní difúzí přes membránu. Dochází k akumulaci chelátu

v periplazmě. Následně se hořčnatý chelát disociuje a tím umožňuje slabě lipofilnímu a nenabitému tetracyklinu přejít do cytoplasmy. Stejně je transportována lipofilní a neutrální molekula tetracyklinu přes cytoplazmatickou membránu gram-pozitivních buněk. V cytoplazmě je tetracyklin opět komplexován s hořčíkem a váže se na ribozom. Vazba tetracyklinu na ribozom je reverzibilní. Příjem tetracyklinu je částečně závislý na energii a zahrnuje pasivní difúzi, protonovou hybnou sílu a hydrolýzu fosfátové vazby [31].

Jako mechanismy rezistence byly popsány: eflux (vyučování antibiotika z buňky), ochrana ribozomů, enzymová inaktivace tetracyklinů, rRNA mutace [31].

Nejběžnějšími efluxními pumpami pro tetracykliny jsou členy hlavní transportní superrodiny (MFS – rodina membránových transportních proteinů, které usnadňují pohyb malých rozpuštěných látek přes buněčné membrány v reakci na chemoosmotický tlak). Avšak existují práce [32], které potvrzují pumpu bez MFS [31]. Největší skupinou jsou léčivo - H^+ transportní proteiny obsahující 12 transmembránových helixů a zahrnující dobře charakterizované efluxní pumpy jako je TetA. Tyto efluxní pumpy vyměňují proton za molekulu tetracyklinu proti koncentračnímu spádu. Jedná se tedy o děj, který je závislý na dodané energii [30]. Efluxní proteiny jsou zakódovány v plazmidovém genu. Exprese tohoto genu je jednoduše regulována různě umístěním transkripčním represorovým genem patřícím do rodiny TetR. Geny tetA a tetR jsou umístěny odděleně pomocí dvou identických sekvencí operátoru, které jsou od sebe 11 pb. Pokud se tetracyklin nenachází v buňce, protein TetR se naváže na operátorovu sekvenci a blokuje přístup promotoru k tetA a tetR. Pokud se v buňce nachází komplex tetracyklinu s hořčnatým iontem, naváže se na TetR protein. Komplex se váže na TetR s tisíckrát větší afinitou než na ribozom, což znamená, že nejprve dojde k expresi genu, než tetracyklin začne inhibovat proteosyntézu [27].

V cytoplazmě se mohou nacházet proteiny ochraňující ribozomy před reakcí s tetracyklinem, čímž poskytují širší spektrum rezistence, než je tomu u bakterií s efluxem. Dnes je známo 12 ribozomálních ochranných genů. Tyto geny jsou šířeny mezi bakteriemi pomocí mobilních genetických prvků. Nejznámějšími a nejlépe charakterizovanými proteiny jsou Tet (O) a Tet (M), které jsou si ze 75 % podobné. Tyto proteiny katalyzují GTP – dependentní uvolňování tetracyklinu z ribozomu [31].

Další alternativou rezistence bakteriálních buněk vůči tetracyklinům je enzymatická inaktivace, která má malý význam v klinické praxi. Enzym, který umožňuje inaktivaci, je TetX. Byl izolován z plazmidu mikroorganismu *Bacteroides fragilis*. TetX je flavin-dependentní monooxygenáza, která za přítomnosti NADPH a O_2 ireverzibilně hydroxyluje tetracyklin na pozici 11. Je tedy zřejmé, že podmínkou pro tuto rezistenci je to, že mikroorganismus musí být aerobní. Tento produkt je výrazně nestabilní a dochází k jeho rozpadu ve fyziologickém pH [33].

Posledním typem rezistence je možná mutace 16S RNA, která byla objevena u kožních propionibakterií. Tyto mikroorganismy jsou spojeny s akné, na které se běžně užívají tetracyklinové přípravky. Mutace cytosinu na guanin v ekvivalentní pozici 1058 dělá tetracyklin neefektivním. Toto je genetická mutace, tedy není přítomná na mobilních částech [27, 30].

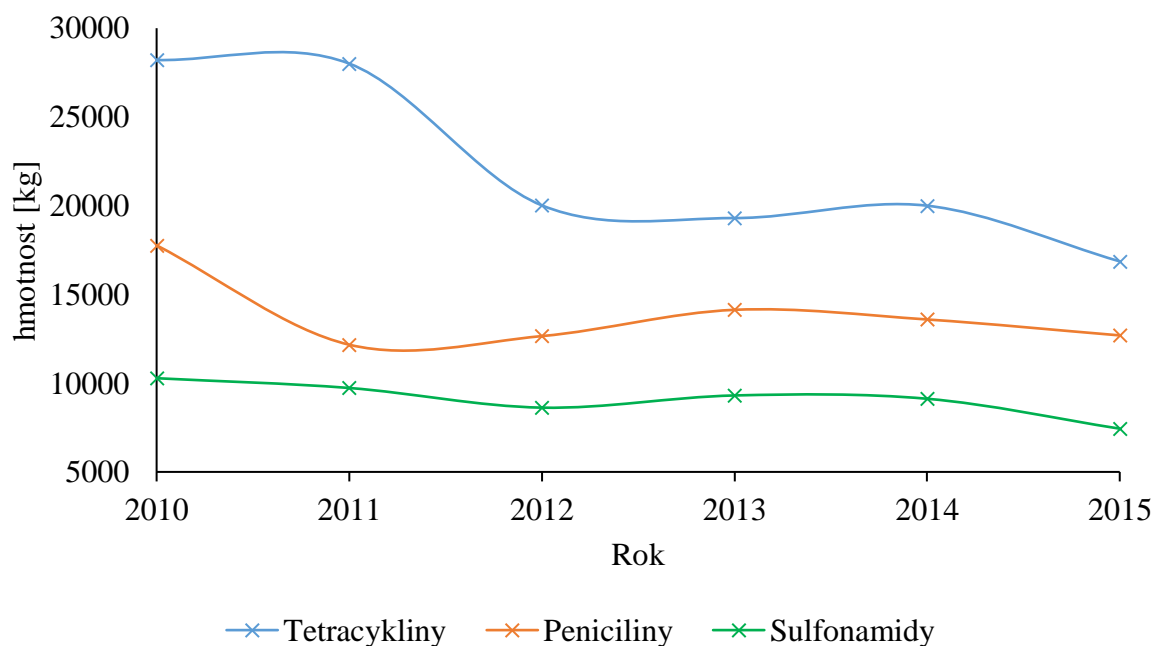
V dnešní době je předepisování farmak na bázi tetracyklinu omezené. Nejenom kvůli vzrůstající rezistenci mikroorganismů, ale i díky řadě nežádoucích účinků. V České republice

se využívá podle vyhlášky č. 85/2008 Sb. chlortetracyklin - hydrochlorid, oxytetracyklin - hydrochlorid, oxytetracyklin dihydrát, tetracyklin, tetracyklin - hydrochlorid, doxycyklin - hydrát, doxycyklin monohydrát, minocyklin - hydrochlorid dihydrát. Jednotlivá medikace se liší v době účinku, v distribuci a v nežádoucích účincích [34]. Nežádoucích efektů je celá řada. Tetracykliny se mohou ukládat do rostoucí kostní tkáně a narušovat její růst a barvit nově rostoucí zuby. Vzniká komplex tetracyklinu s ortofosfátem vápenatým, který způsobuje žlutohnědé fluorescenční zbarvení. Proto by se tato antibiotika neměla používat během prvních 14 dnů těhotenství a u dětí do 12 let [35]. Jelikož jsou to širokospektrá antibiotika, mohou způsobovat superinfekce (infekce, která se rozvíjí v průběhu jiné, již probíhající nákazy) a dysmikrobie (narušení bakteriální mikroflóry ve střevě). Při užití tetracyklinových antibiotik jsou častými vedlejšími příznaky zažívací potíže, poruchy jater a slinivky. Někdy se vyskytuje fotodermatóza (zvýšená citlivost kůže na sluneční světlo, kopřivka, puchýře, zarudnutí) nebo alergie [34]. Pokud se však dodrží dávkování, jsou tyto antibiotika považována za bezpečná a vedlejší efekty se často nevyskytují. Většina pacientů snáší i dlouhé aplikační cykly. Tetracykliny mají nízkou toxicitu, jsou lehce vstřebatelná a levná [35].

Tetracykliny bývají většinou podávány orální cestou. K jejich absorpci dochází především v žaludku a z menší části v tenkém střevě. Absorpce antibiotik je také ovlivněna přítomností potravin. Negativní vliv na absorpci antibiotik mají zejména dvojmocné ionty, například vápníku, se kterými tetracykliny vytváří chelátové formy. Tetracykliny jsou využívány pro léčbu gastritidy z *Helicobacter pylori*, malárie, minocyklin s oflatoxinem proti leprě, akné, tyfu, choleře, respiračním onemocněním, chlamydiím a dalším [36].

Tetracykliny jsou nejpoužívanější antibiotika ve veterinární medicíně (Obrázek 13), avšak jejich spotřeba klesá. Tetracykliny společně s peniciliny a sulfonamidy tvořily v roce 2015 v ČR až 75,5 % všech spotřebovaných antibiotik. Je tedy očividné, že v ČR se stále používají širokospektrá antibiotika namísto úzkospektrálních antibiotik s individuálním přístupem k léčbě [37]. Data z OIE (World Organisation of Animal Health) vykazují stejný trend v Evropě jako data z ČR [38].

Hlavní veterinární využití je při léčbě gastrointestinálních, respiračních a kožních bakteriálních infekcí, infekcí pohybového aparátu a močových cest u drůbeže, skotu, ovcí a prasat či domácích mazlíčků [28, 39]. Tetracykliny mohou být využívány na léčbu brucelózy, většinou v kombinaci s rifampinem a streptomycinem [29]. U přežvýkavců se využívají proti infekcím přenášených klíšťaty jako je anaplazmóza, klíšťová horečka. U krav se hojně využívají k léčbě mastitidy [40]. Přežvýkavcům nemohou být tetracykliny podávány perorální formou, protože by se zničila jejich bachorová mikroflóra a došlo by k oslabení trávicích procesů [28]. Dříve byly tetracykliny podávány v subterapeutickém množství jako doplněk stravy pro podporu růstu. Legislativa Evropské unie nedovoluje tuto cestu využití od roku 1975 [39].



Obrázek 13: Vývoj ve spotřebě antibiotik ve veterinární medicíně v letech 2010-15. Mezi tetracykliny jsou započítány (tetracyklin, chlortetracyklin, oxytetracyklin, doxytetracyklin) [37]

2.2 Mastitida

Kravska mastitida je nejběžnější onemocnění krav v mlékárenském průmyslu. Je definována jako zánětlivá reakce parenchymu mléčné žlázy, která může být infekční, traumatická anebo toxická. Projevuje se fyzikálními, chemickými a bakteriologickými změnami v tkáni mléčné žlázy a v emulsi [41]. Během tohoto onemocnění je mléko znehodnoceno antibiotiky, které se používají na léčbu, a z mikrobiálního hlediska je též nepřijatelné. Dle Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 ze dne 29. dubna 2004, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu, nesmí počet mikroorganismů v syrovém mléce při teplotě 30°C překročit 100 000 v jednom mililitru a počet somatických buněk nesmí být vyšší jak 400 000 na jeden mililitr. Proto musí být mléko nemocných a léčených krav vždy staženo z trhu. Toto onemocnění má velkou bakteriální diversitu (bakteriální i nebakteriální patogeny), což vedlo k vývoji nových různých terapeutických strategií. V současné době se nejprve identifikuje patogen a následně se nasadí léčba vhodnými antibiotiky. Tetracykliny jsou jedny z nejpoužívanějších antibiotik na toto onemocnění, jelikož jsou relativně bezpečné a zároveň jsou širokospektrální, a tedy působí na G+ a G- bakterie a na typický rod *Mycoplasma*. Zajímavé však je, že pokud se testuje aktivita tetracyklinů v mléce, tak je tato aktivita nižší než při testech na umělém médiu. Jednou z teorií je, že se v mléce vyskytují rezistentní bakterie. Druhým možným vysvětlením je, že se tetracykliny vážou na tuk/kaseinové micely/vápník a tím ztrácí svoje antimikrobiální vlastnosti [42].

2.3 Legislativa

Léčiva se podávají pro kontrolu endoparazitů a ektoparazitů a se podávají zvířatům několika způsoby – injekčně, orálně v potravě a vodě, místně na kůži nebo infuzemi. Velká část veterinárního ošetření mléčného skotu zahrnuje intramuskulární infuzi antibiotik k potlačení mastitidy. Všechny cesty pak mohou vést k tomu, že se zbytky antibiotik objeví v mléce a mléčných výrobcích. Antibiotika v mléce představují problém z hlediska rizik pro člověka, ale způsobují také technologické problémy při výrobě mléčných produktů [43].

Maximální limit reziduí (MLR) stanovuje Evropská unie v potravinách živočišného původu v nařízení Komise EU č. 37/2010 ze dne 22. prosince 2009 o farmakologicky účinných látkách a jejich klasifikaci podle maximálních limitů reziduí v potravinách živočišného původu. Maximální limit reziduí oxytetracyklinu a tetracyklinu v mléce je 100 µg/kg, dle tohoto nařízení.

Evropská unie v nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2019/6 ze dne 11. prosince 2019 o veterinárních léčivých přípravcích a o zrušení směrnice 2001/82/ES stanovila ochrannou lhůtu. Ochranná lhůta je definována jako „Minimální doba mezi posledním podáním veterinárního léčivého přípravku zvířeti a produkcí potraviny z tohoto zvířete, která je za běžných podmínek použití nezbytná k tomu, aby bylo zajištěno, že tyto potraviny nebudou obsahovat rezidua v množstvích, která ohrožují veřejné zdraví.“ V případě mléka ze zvířat, které produkují mléko pro lidskou spotřebu, nesmí být ochranná lhůta kratší než: (i) nejdelší ochranná lhůta stanovená pro mléko v souhrnu údajů o přípravku pro jakýkoliv druh zvířete vynásobená koeficientem 1,5, (ii) sedm dnů, pokud léčivý přípravek není registrován pro zvířata, která produkují mléko pro lidskou spotřebu, (iii) jeden den, pokud je ochranná lhůta léčivého přípravku nulová.

2.4 Vysoko-účinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je separační technika, která může být prováděna buď ve sloupci, nebo rovině za využití kapalné mobilní fáze a pevné stacionární fáze. V současnosti jsou využívány malé částice a relativně vysoký vstupní tlak, což charakterizuje vysoce výkonnou (vysokotlakou) kapalinovou chromatografii se zkratkou HPLC [44].

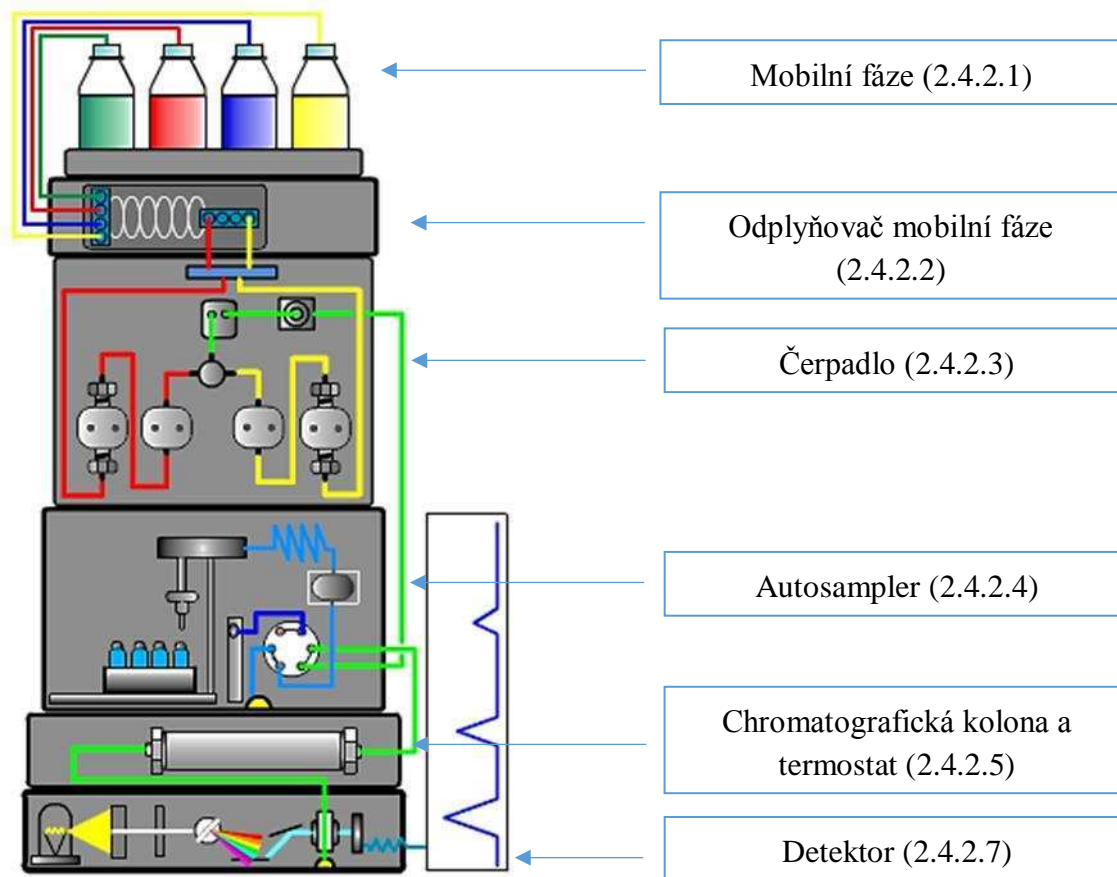
Chromatografická technika je založena na separaci složek na základně rozdílné afinity analytu ke stacionární (nepohyblivé) a mobilní (pohyblivé) fázi. Tato technika je vhodná pro separaci molekul v biomedicině, přírodních látek a iontů. HPLC nabízí velkou variabilitu separace. Také má mnoho různých metod detekce. Pomocí této metody lze dosáhnout stopového stanovení sloučeniny [45].

2.4.1 Historie

Před příchodem HPLC techniky bylo učiněno několik důležitých objevů, například: objevení chromatografie roku 1890, iontově výměnné chromatografie v 50. letech 20. století a gelové permeační chromatografie v 60. letech 20. století. Jelikož na začátku vývoje byl průtok rozpouštědel přes stacionární fázi zajišťován pouze gravitační silou působící na rozpouštědlo, byla kapalinová chromatografie pomalá a neefektivní. Separace pak probíhala několik hodin. V tu dobu byla účinnější plynová chromatografie, která však nemohla být využita pro analýzu tepelně nestabilních a těkavých vzorků. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie byla objevena na konci 60. let 20. století. V 70. letech se začala používat čerpadla a injektory, ze kterých byl sestaven jednoduchý HPLC systém tak jak je znám v dnešní době [45, 46].

2.4.2 Kapalinový chromatograf

Kapalinový chromatograf se skládá z několika částí (Obrázek 14).



Obrázek 14: Kapalinový chromatograf [47]

2.4.2.1 Mobilní fáze

Mobilní fáze musí být kompatibilní s analytem z hlediska stability a rozpustnosti, aby nedocházelo k ucpávání kolony a analyty mohly být detekovány při výstupu z kolony. Mobilní fází může být čisté rozpouštědlo nebo směs rozpouštědel. Často se používá směs organických rozpouštědel v různém poměru. Většinou se postupuje od mobilní fáze, kde je nejvíce zastoupena voda, po mobilní fázi se zvyšujícím se zastoupením organických rozpouštědel [48].

Pro ochranu chromatografu a kolony je vhodné před použitím přefiltrovat mobilní fáze. Složky mobilní fáze se nachází ve skleněných nádobách, aby nedocházelo k velkému odpařování. Zároveň musí docházet k vyrovnávání tlaku v zásobních lahvích [49].

2.4.2.2 Odplyňovač mobilní fáze

Poté dochází k odplynění. Tento krok zabrání oxidační degradaci vzorku a mobilní fáze. Vzduchové bublinky v koloně mohou způsobovat mechanickou destrukci stacionární fáze. Při dávkování vzorku může docházet ke špatné opakovatelnosti dávkovaného objemu vzorku. V detektoru mohou způsobit zvýšený šum na základní linii chromatogramu, měnit retenční časy. K externímu odplynění se využívá ultrazvuková vodní lázeň. Základní mechanismy odplynění v kapalinovém chromatografu jsou – probublávání heliem, ultrazvukové odplynění, vakuové odplynění nebo refluxování. Probublávání heliem a vakuové odplynění jsou

nejpoužívanější metody v současnosti. Vakuový odplyňovač je nejvíce používán, protože je jeho použití levnější a jednodušší. Jeho princip spočívá v tom, že mobilní fáze vstupuje do vakuové komory v polopropustné kapiláře. Veškerý plyn prochází kapilárou do vakua [47, 49].

2.4.2.3 Čerpadlo

Čerpadlo musí být robustní, aby vytvořilo vysoké tlaky v systému, ale zároveň musí být vysoce přesné při jakémkoliv průtoku. Jednou třídou jsou čerpadla, která vytváří konstantní tlak mobilní fáze. Průtok mobilní fáze je pak určen odporem průtoku mezi čerpadlem a výstupem z detektoru. Druhá skupina je založena na konstantním průtoku a různém tlaku, který závisí na odporu proudění. Odpor se pak může měnit s časem, teplotou, kolonou, vzorkem atd. V kapalinové chromatografii se využívají častěji čerpadla s konstantním průtokem [50]. Čerpadlo má za úkol dodávat nepřetržitý a stabilní tok mobilní fáze v systému bez pulzů do bez ohledu na protitlak. Rozdíly v objemu mohou vést k rozdílům v retenčních časech a rozlišení píku. Pokud je nestabilní tlak (vytváří se pulzy), v systému dochází k vysokému šumu a tím ke snížení limitu detekce a kvantifikace. Do moderních čerpadel se přidávají tlumiče tlakových pulzů, které mají za úkol eliminovat tlakové rázy [47, 49].

Můžeme mít pumpy, které nám umožní do systému zavádět pouze jednu mobilní fázi (izokratická pumpa), pak musíme mít směs předpřipravenou, směs dvou látek (binární pumpa) nebo kombinaci až 4 složek mobilní fáze (kvartérní). Binární pumpa funguje na základě dvou samostatných pístových čerpadlech, které jsou připojené k nízkoobjemové směšovací komoře a k jedinému pulznímu tlumiči. Rychlost čerpání nebo objem složky mobilní fáze je řízena pomocí počítače, aby byl poskytnut požadovaný celkový průtok. Kvartérní pumpa využívá solenoidového ventilu, který je otevřen pro danou složku mobilní fáze po určité době, aby vznikla požadovaná směs ve směšovacím zařízení před čerpadlem. [47, 49].

V závislosti na typu čerpadla může být eluce gradientová nebo izokratická. Izokratická eluce využívá konstantní složení mobilní fáze po celou dobu analýzy. Gradientová eluce mění složení mobilní fáze během analýzy za využití online systému. Často se využívá, pokud máme vzorek s látkami o širokém rozpětí polarit, nebo analýza při izokratické eluci je nepřiměřeně dlouhá. Sekundární využití je při čištění kolony. Může vést ke zlepšení rozlišení, detekce, zkrátit čas analýzy. Na druhou stranu je nákladnější na vybavení laboratoře, musíme počítat s časem pro znovuobnovení prostředí v systému. Gradientová eluce může být kroková nebo kontinuální [47, 49].

2.4.2.4 Dávkování vzorku

Vstřikování vzorku se provádí za atmosférického tlaku do systému s vysokým tlakem, což představuje kritický krok v chromatografickém procesu. Jsou tři možnosti jak vzorek dávkovat: injekční stříkačkou přes septum, smyčkovým ventilem, automatickým vstřikovacím systémem (autosampler) [49].

Dávkování přes septum na kolonu je metoda aplikace vzorku, která vytváří rozmývání vzorku a to není vhodné pro analýzu. Smyčkový ventil je využíván při manuálním dávkování vzorku. Analyt se nastříkne pomocí injekční stříkačky do vzorkové smyčky, která je následně změnou ventilu připojena do vysokotlakého proudu mobilní fáze. Existují dvě metody načtení

vzorku: kompletní plnění – smyčka má požadovaný objem injekce a je celá naplněná vzorkem; částečné plnění – smyčka má alespoň dvojnásobný objem než je objem analytu [47, 49].

Autosampler je v dnešní době nejvyužívanější metodou dávkování vzorku. Všechny autosamplery mají stejné základní komponenty, které zahrnují injekční ventil, injekční stříkačku nebo vzorkovací jehlu, smyčku buď fixního, nebo nastavitelného objemu, dávkovací čerpadlo pro nasávání vzorku z lahvičky a vstřikovací port, kterým se vzorek zavádí do smyčky. V současnosti mohou být autosamplery také termostatované, což se využívá pro vzorky citlivé na teplotu [49].

Vzorek je ve vialce, která má standardní velikost. Každá nádobka je zašroubována víčkem se septem, aby mohlo dojít k odebrání vzorku pomocí vzorkovací jehly. Vialka je umístěna na přesně daném místě v chromatogramu, které může být temperované na určitou teplotu [47]. Vzorek musí být v nadbytku, jelikož jehla nesmí narážet na dno. Pokud máme velmi malé množství vzorku, lze tento problém vyřešit vialkou s konickým tvarem [51].

2.4.2.5 Chromatografická kolona

Chromatografické kolony by měly být vyrobeny z chemicky interního materiálu, který je mechanicky odolný a vydrží tlak 200–600 MPa. Bylo studováno několik materiálů jako sklo nebo polyetherketonová vlákna (PEEK), avšak tyto materiály neměly dostatečnou mechanickou pevnost. Dnes jsou kolony většinou vyrobeny z nerezové oceli 316, která je korozivzdorná a zároveň vysoce mechanicky odolná. Vnitřek kolony by neměl mít drsný povrch (drážky nebo mikroporézní struktury), takže ocelové kolony ve tvaru válce musí být buď přesně vyvrtány nebo vyleštěny. Každá kolona je uzavřena fritami, které mají menší velikost pórů než je velikost částic v koloně. Frita brání uvolňování stacionární fáze do chromatografického systému. Dále je potřeba spojit kolonu s kapilárou a to s co nejmenším rozmytím vzorku a bez úniku analytu. K tomu se nejčastěji využívá nerezová ferrule a PEEK spojky. Toto připojení poskytuje výhodu spojování kolon s kapilárou, protože ho lze snadno přizpůsobit kolonám různých výrobců [51, 52].

Délka chromatografické kolony bývá 5-30 cm a obsahe mikročástice stacionární fáze (do 10 μm). Pokud je potřeba větší počet teoretických pater, je obvykle vhodnější použít kolony s menšími částicemi než delší kolonu. Delší kolona zvyšuje retenční objem a zhoršuje detekční limit. Distribuce velikosti částic by měla být co nejužší. To proto, že nejmenší částice určují propustnost kolony a největší částice fixují počet teoretických pater. Malé částice vytvářejí vysoký odpor proudění a velké částice jsou zodpovědné za rozšíření pásma vzorku [51].

Téměř všechny separace na koloně s reverzní fází mají nižší retenční čas při vzrůstající teplotě, protože se snižuje viskozita mobilní fáze a ta začne proudit rychleji. Také se zlepšuje přenos hmoty analytu (zlepšuje se efektivita). Zvýšení teploty je pak omezeno bodem varu mobilní fáze a teplotní stability analytů. Ohřev kolony zajišťuje termostat. Chromatografické procesy jsou závislé na teplotě. [47, 49].



Někdy může být využívána předkolona, která je umístěna mezi vstřikovačem vzorku a kolonou. Nejčastější funkcí předkolony je ochrana kolony před ucpáváním a poškozením případnými nečistotami ve vzorku [51].

Při správném výběru a namontování nemají předkolony vliv na separaci. Tyto kolony se vyměňují v pravidelných intervalech nebo po určitém počtu injekcí, aby byla zajištěna maximální životnost separační kolony [51].

2.4.2.6RP-HPLC



Chromatografie s reverzními fázemi je termín používaný pro metodu, která má mobilní fázi více polární než stacionární fázi.

Nejčastěji používanou stacionární fází v RP-HPLC je chemicky vázaný n-alkan s 18 atomy uhlíku vázaný na silikagelu, nebo kratší n-alkan s 8 atomy uhlíku. Doba eluce analytu vzrůstá se vzrůstající délkou alkylového řetězce. Dalšími funkčními skupinami ve stacionární fázi jsou cyklohexanové nebo fenolové skupiny, které jsou polárnější než alkylové skupiny (Obrázek 15) [51]. Ačkoliv většina separací je založena na koloně se stacionární fází C18, je jich velké množství typů. Existují rozdíly v délce, vnitřním průměru, velikosti částic atd. To může mít vliv na separaci. Selektivitu pak ovlivní hustota navázaného n-alkylu C18 na silikagel (ovlivnění polarita kolony) [53]. Variantou k modifikovanému silikagelu jsou polymerní stacionární fáze například: poly(metylmakrylát) nebo poly(styren-divinyl benzen). Polymery jsou nanášeny na silikagel a mají dobré mechanické a chemické vlastnosti [47].

Stacionární fáze		
C18	 Vrůstá retence nepolárních analytů	 Klesá hydrofobicita/ Vzrůstá polarita
C8		
C4		
Nitril		
Fenyl		
Amino		

Obrázek 15: Typické stacionární fáze při kapalinové chromatografii s reverzními fázemi [47]

Pro chromatografii s reverzními fázemi se skládá mobilní fáze z vody (polární část) a organického modifikátoru. Mobilními fázemi jsou nejčastěji metanol a acetonitril, používána jsou i další rozpouštědla (Obrázek 16) [51].

Mobilní fáze		
Methanol	 Vrůstá polarita	 Klesá eluční síla
Acetonitril		
Ethanol		
Isopropanol		
Dimethylformamid		
Propan-1-ol		
Dioxan		
Tetrahydrofuran		

Obrázek 16: Vlastnosti složek mobilní fáze při chromatografii s reverzními fázemi [51]

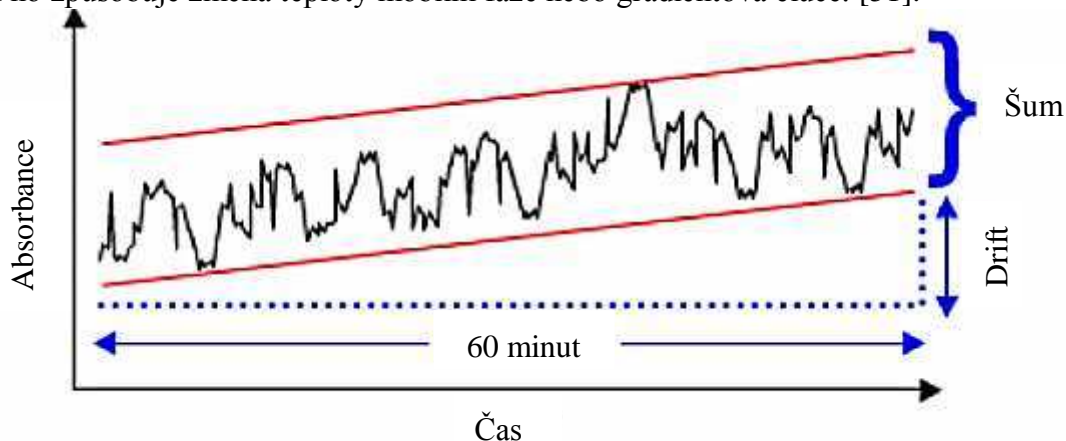
2.4.2.7 Detektory

Detektory by měly být schopné rozeznat analyt od zbytku eluátu vycházejícího z kolony na základně určité fyzikální nebo chemické vlastnosti analytu. Musí umět detekovat změny v mobilní fázi, převádět je na elektrický signál a poté je přenést do zapisovače nebo na displej, kde se bude zobrazovat odchylka od základní linie. Ideální detektor by měl být stejně citlivý na všechny eluované látky, nebo by měl zaznamenávat pouze ty, které jsou předmětem zájmu. Detektor by také měl být stabilní i při změnách teploty nebo složení mobilní fáze (jako například u gradientové eluce), schopný analyzovat i stopové množství, objemově malý (snížení pravděpodobnosti rozmývání píků), citlivý k malým změnám (zachycení úzkých píků), snadno manipulovatelný, robustní a levný [51].

Výběr vhodného detektoru se řídí především citlivostí, selektivitou, šumem a driftem, detekčním limitem, linearitou, objemem měrné cely [51].

Komerčně dostupnými detektory pro HPLC jsou UV-VIS, FLD (fluorescenční detektor), ELSD (odpařovací detektor rozptylu světla), MS (hmotnostní spektrometr) a CAD (aerosolový detektor nabitých částic), radiometrický detektor, refraktometrický detektor a další. Volba detektoru pak závisí na konkrétní aplikaci [54].

Jako nejmenší detekovatelný signál se obvykle označuje trojnásobek výšky průměrného základního šumu a všechny analyty o nižší koncentraci přestávají být rozlišitelné od šumu. Šum je zvýšené nepravidelné zesílení odezvy detektoru od základní linie, i když není eluován žádný analyt. Vysokofrekvenční krátkodobý šum může být způsoben nedostatečným ustálením detektoru nebo zesilovací elektronikou. Druhou variantou je nízkofrekvenční dlouhodobý šum, který se může vyskytovat s vysokofrekvenčním šumem najednou. Mobilní fáze se výrazně podílí na hladině šumu (nečistoty, bubliny, změna průtoku atd.). Hladinu šumu může ovlivňovat změna teploty, heterogenita eluátu, změna tlaku. Drift je sklon základní linie. Nejčastěji ho způsobuje změna teploty mobilní fáze nebo gradientová eluce. [51].



Obrázek 17: Znázornění šumu a driftu na chromatogramu [47]

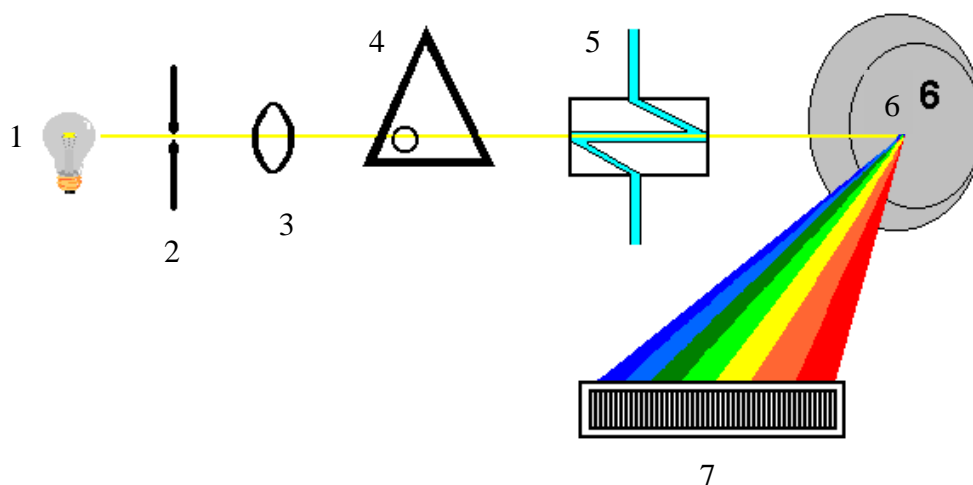
UV-VIS detektor je nejběžněji užívaným detektorem pro HPLC. Princip tohoto detektoru je založen na absorpci záření jednotlivými molekulami analytu v mobilní fázi v rozmezí vlnových délek 190-600 nm. Jsou to detektory poměrně citlivé, s vysokým rozsahem linearit a relativně stabilní při změnách teploty nebo gradientové eluce [51, 54]. Koncentrace

vzorku je dána absorbancí, a jejich závislost je popsána pomocí Lambert-Beerova zákona (rovnice 1) [54].

$$A = \varepsilon cd \quad [1]$$

Když roztok absorbující UV-VIS záření prochází průtokovou komorou, generuje se signál, který je úměrný koncentraci analytu. Detekovány jsou pouze molekuly, které absorbují UV-VIS záření. Sloučeniny by měly obsahovat dvojnou vazbu, halogenidy, karbonylovou nebo nitro skupinu, dvě konjugované dvojně vazby, aromatický kruh, nebo obsahovat anorganické ionty (brom, jod, dusitany apod.). Samotná mobilní fáze by měla být vybírána velmi opatrně tak, aby neabsorbovala vůbec nebo při jiné vlnové délce [51, 52].

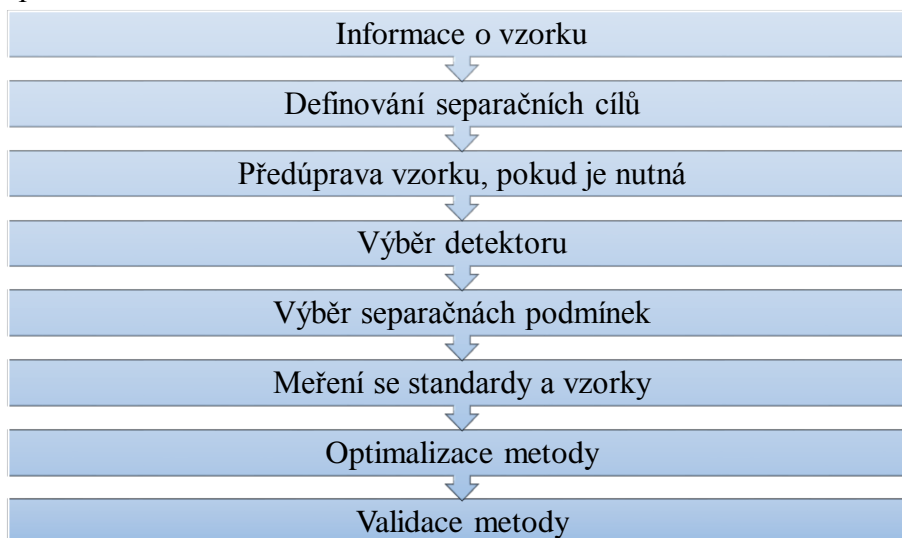
Existují 3 typy absorpčních detektorů: s fixní vlnovou délkou, měnitelnou vlnovou délkou a fotodiodové pole. Detektor s fixní vlnovou délkou se využívá, pokud je vyžadována maximální odezva, protože produkuje záření s úzkým rozsahem vlnových délek o vysoké intenzitě. Tento detektor je levnější s porovnáním s jinými zdroji záření. Druhým typem detektoru je detektor s měnitelnou vlnovou délkou, který využívá záření s poměrně širokým pásmem UV-VIS spektra, ze kterého je vybírána jedna vlnová délka. Tento typ detektoru je dražší než detektor s pevnou vlnovou délkou. Pokud je potřeba snímat celé absorpční spektrum je nutné využít detektor s fotodiodovým polem (Obrázek 18). Pro identifikace neznámých vzorků je užitečné porovnání chromatograficky generovaných spekter. Hlavní nevýhodou tohoto detektoru je nižší citlivosti [54, 55].



Obrázek 18: Schéma detektoru s fotodiodovým polem. Záření, které je produkováno zdrojem (1) prochází štěrbinou (2), čočkou (3), clonou (4) a měrnou celou (5), kde dochází k absorpci záření. Poté se zeslabené záření rozkládá holografickou mřížkou (6) na jednotlivé vlnové délky, které dopadají na jednotlivé fotodiody [55]

2.5 Vývoj a validace metody HPLC

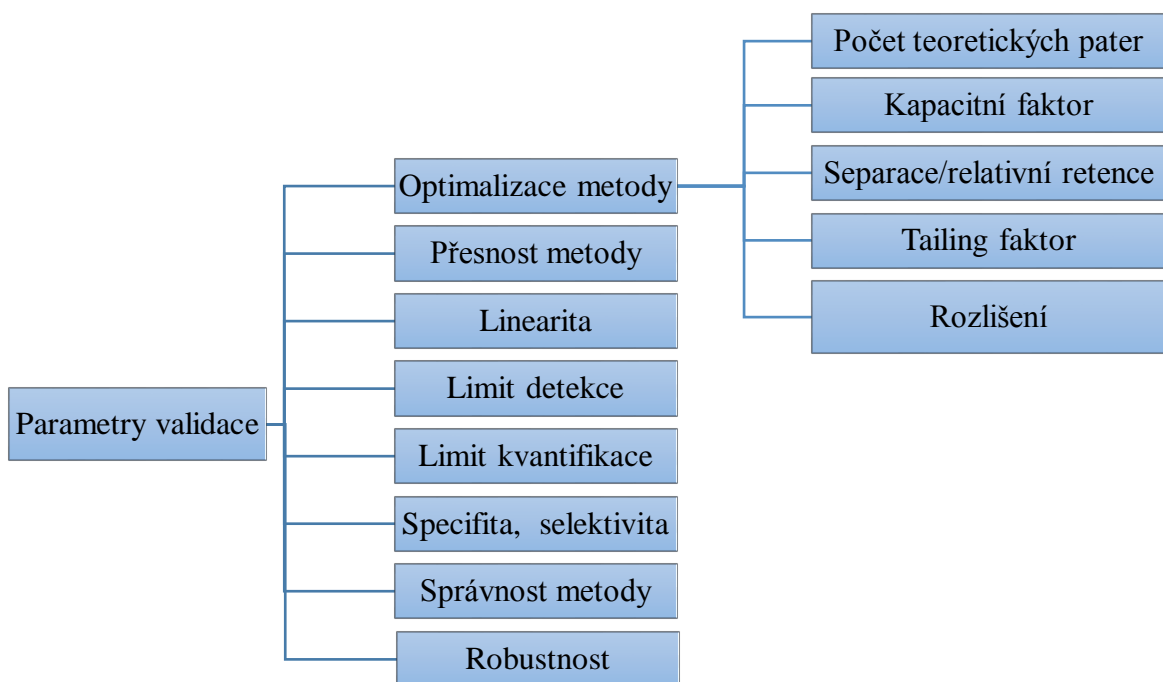
Vývoj a validace analytických metod je důležitým krokem v různých průmyslových odvětvích. Celý proces vývoje má několik kroků (Obrázek 19). Jedním z nejdůležitějších kroků je získat informace o sloučenině nebo analytu z literatury, to znamená, zjistit veškeré fyzikální a chemické vlastnosti. Od tohoto bodu se odvíjí celý vývoj metody. Druhým krokem je definování separačních cílů (např. stanovení dané látky ve vzorku, stanovení více látek ve vzorku, stanovení koncentrace látky, aj.). Další kroky při vývoji metody se mohou odlišovat při jednotlivých analýzách (potravinových, environmentálních, farmaceutických apod.), ale obecný princip zůstává zachován [57, 58].



Obrázek 19: Kroky při vývoji metody HPLC [57]

Optimalizace metody je předposledním krokem při vývoji metody. Při hledání optimálních podmínek musíme nejprve najít parametry, které významně ovlivňují veličinu, kterou měříme (například absorbance, plocha píku). Druhým krokem je experimentální nalezení optimální kombinace těchto parametrů [59]. Při optimalizaci metody je snahou dosáhnout dostatečné separace a limitu detekce pokud možno v co nejkratším čase [61].

Validace metody je postup, který zaručuje, že proces bude trvale poskytovat produkt odpovídající předem určené specifikaci. Avšak je také nutné definovat optimální podmínky pro využití dané metody. Jedná se tedy o prokázání, že analytická metoda je vhodná pro zamýšlené použití. Nebo se jedná o proces, během kterého se určuje, zda je systém vhodné použít pro získání relevantních dat [56]. Dokumentace validace by měla začínat stanovením postupu, který má být validován. Měla by shrnovat vývoj (optimalizaci) metody, plán validace a všechny informace o zpracování dat. K validaci analytické metody by měli být využity některé z parametrů v obrázku 20 [61, 62]. Validace je vždy ovlivněna riziky, náklady a technickými možnostmi. Z toho vyplývá vztah mezi mírou validace, náklady a množstvím informací o dané analytické metodě [59].

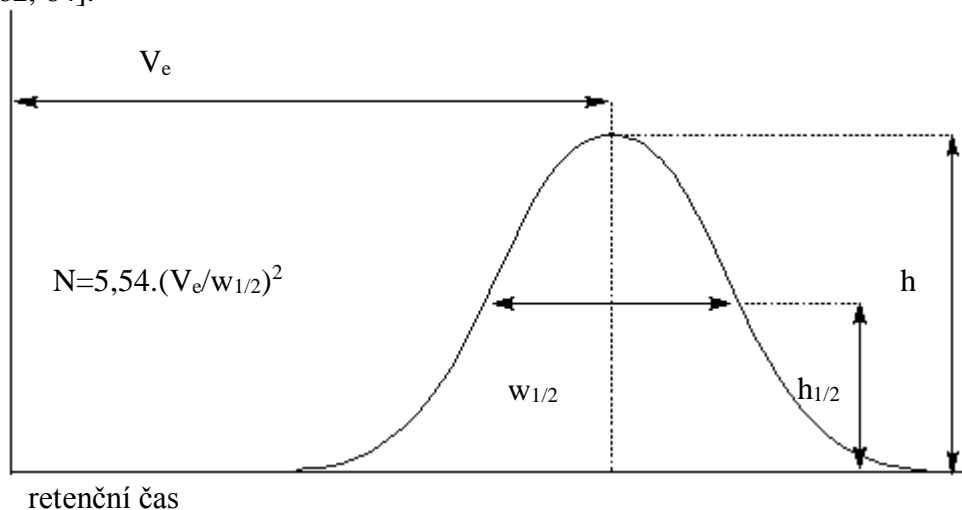


Obrázek 20: Parametry validace [61,63]

2.5.1 Optimalizace v rámci validace metody

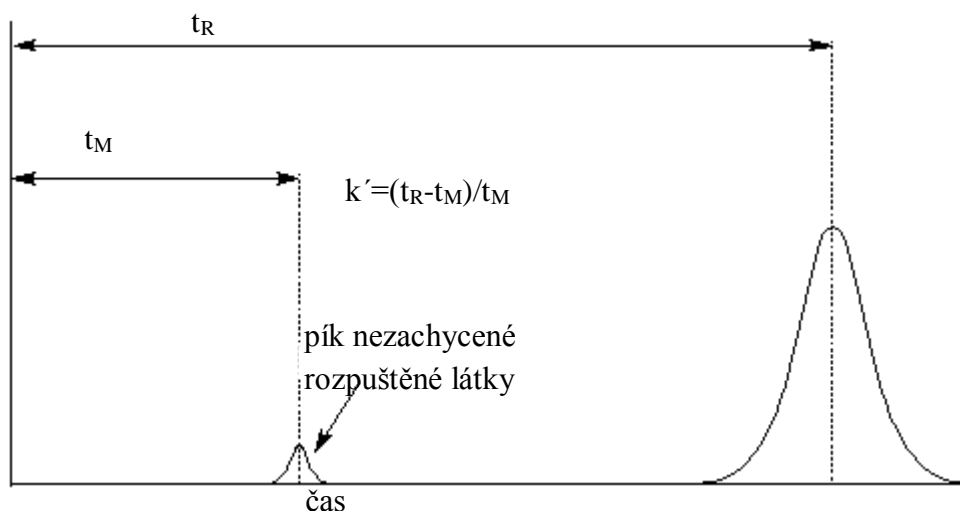
Testování vhodnosti systému bylo považováno farmaceutickým průmyslem za důležité při rozhodnutí, zda se využije daná technika. Dnes se v laboratořích používá chromatografický systém rutinně, proto je nejdůležitější kvalita výsledků [62].

Poččet teoretických pater (N) udává účinnost kolony a charakterizuje ji. Čím více teoretických pater kolona má, tím účinnější je. Pokud potřebujeme zvýšit účinnost kolony, měli bychom volit menší částice stacionární fáze. Výpočet počtu teoretických pater je znázorněn na obrázku 21 [62, 64].



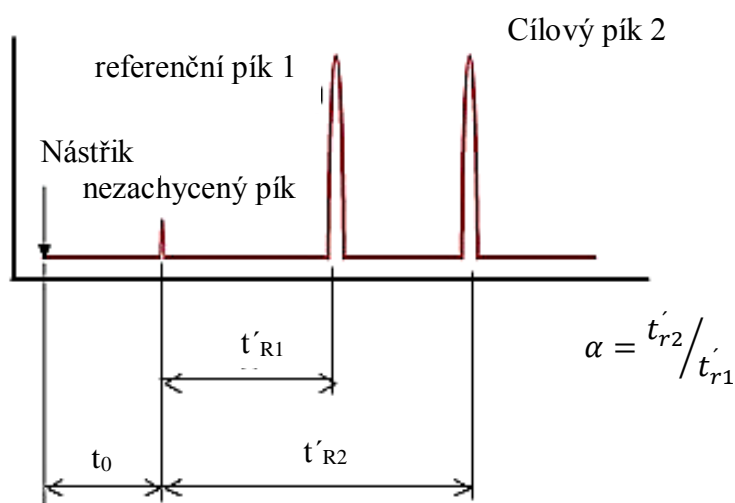
Obrázek 21: Stanovení počtu teoretických pater (N)

Kapacitní faktor nebo též retenční faktor je nezávislý na průtokové rychlosti mobilní fáze, jakož i na rozměrech kolony. Je to míra retence píku analytu vzhledem k píku v mrtvém čase, tedy složce analytu, která nebyla zachycena (Obrázek 22) [62].



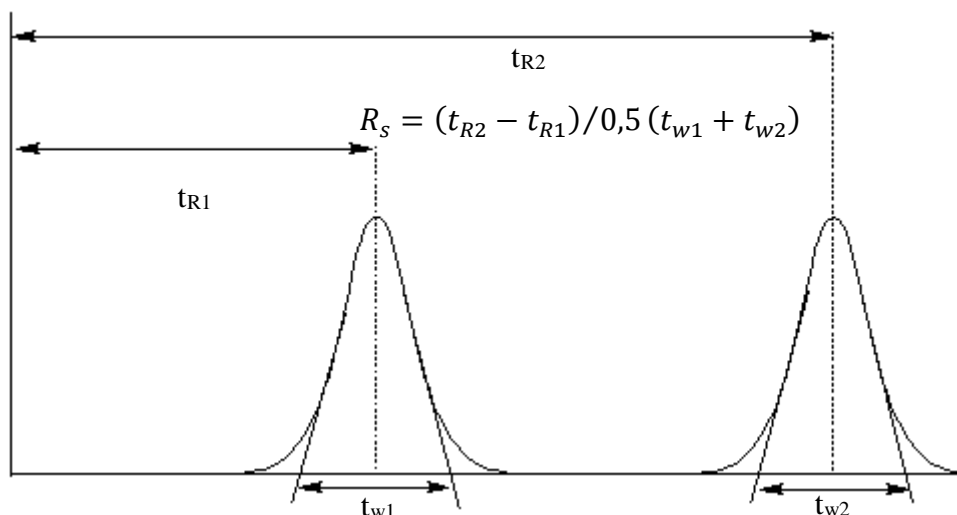
Obrázek 22: Stanovení kapacitního faktoru [57]

Relativní retenční/separační faktor se používá, protože retenční časy mohou být ovlivněny různými parametry. Proto se využívá méně závislá hodnota na koloně a podmínkách analýzy. Tento parametr je vyjádřen relativním poměrem upravených retenčních časů (Obrázek 23). Problém nastává se zvyšující se vzdáleností píku od referenčního píku, protože se zvyšuje chyba měření [62].



Obrázek 23: Výpočet relativního retenčního/separačního faktoru [62]

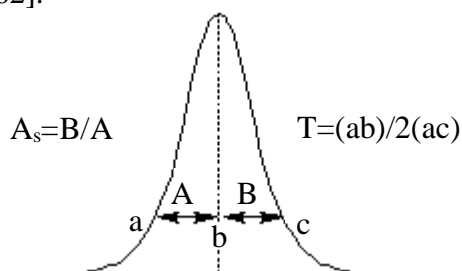
Rozlišení je schopnost kolony separovat dvě látky na dva individuální píky nebo chromatografické zóny. Tato hodnota je závislá na délce kolony, velikosti částic a teplotě. Výpočet lze provést dle obrázku 24. Rozlišovací faktor je funkce kapacitního faktoru, selektivity a počtu teoretických pater, vypočítá se podle rovnice 2 [62].



Obrázek 24: Stanovení rozlišení mezi dvěma píky [62]

$$R = \frac{k'}{1 + k'} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \sqrt{N/4} \quad [2]$$

Chromatografické píky mají v ideálním případě symetrický tvar Gausovi křivky. Nicméně v praxi se setkáváme s deformovanými píky a jejich deformace je vyčíslena **asymetrickým faktorem a tailingovým faktorem**. Často si jsou tyto dva faktory podobné. Vypočítají se podle obrázku 25 [62].



Obrázek 25: Znázornění výpočtu tailing faktoru a faktoru asymetrie [62]

2.5.2 Přesnost metody

Přesnost metody vyjadřuje stupeň rozptylu mezi jednotlivými sériemi měření získaných z vícenásobného odběru ze stejného vzorku za stejných podmínek. Jinak řečeno, vyjadřuje schopnost analytické metody produkovat konzistentní výsledky. Hodnota přesnosti je pak vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka (RSD). Přesnosti známe tři typy: opakovatelnost, reprodukovatelnost a střední přesnost [57, 62].

Opakovatelnost je míra přesnosti analýzy při stejných podmínkách, v krátkém časovém úseku. Mezinárodní konference o harmonizaci (ICH) doporučuje alespoň devět měření (tři koncentrace a tři opakování experimentu) nebo minimálně šest měření při 100% opakovatelnosti, což by mělo být určeno jako směrodatná odchylka, relativní směrodatná odchylka nebo interval spolehlivosti [57, 62].

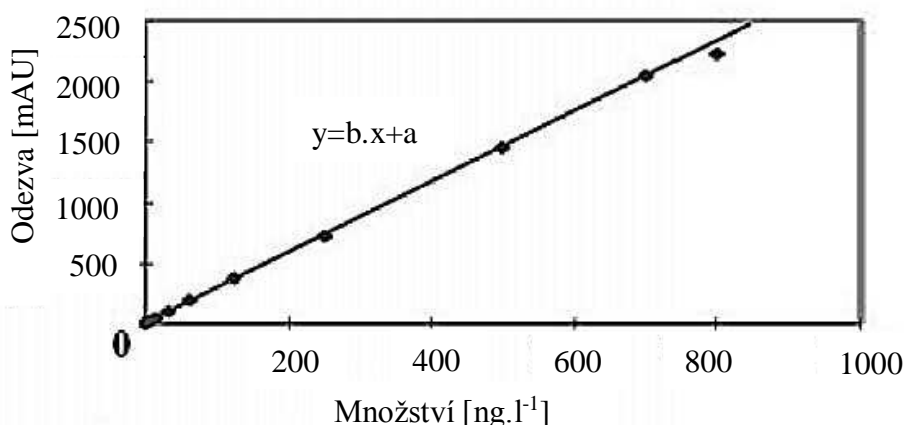
ICH definuje mezilehlou přesnost jako dlouhodobou variantu procesu a určuje se porovnáváním výsledků analýz provedených v jedné laboratoři během několika dní s různými

přístroji, se standardy a činidly od různých výrobců šarží atd. Cílem je ověřit, že metoda poskytne přesné výsledky ve stejné laboratoři po skončení vývojové fáze [57].

Reprodukovatelnost metody (reproducibility) vyjadřuje přesnost analýzy stejného vzorku v různých laboratořích, ale se stejnými parametry metody. Cílem je ověřit, zda metoda poskytne stejné výsledky navzdory rozdílům v prostředí, vybavení, materiálu atd. [57].

2.5.3 Linearita a rozsah

Linearita analytické metody je schopnost získat výsledek měření, který je přímo úměrný koncentraci analytu ve vzorku. Linearita se znázorňuje kalibračním grafem závislosti odezvy na koncentraci vzorku. Linearita je pak zakreslena pomocí křivky metodou nejmenších čtverců a výpočetního vztahu (Obrázek 26). Je nezbytné určit rozmezí, ve kterém je odezva úměrná koncentraci analytu. Vzájemnou závislost dvou proměnných vyjadřuje korelační koeficient. Obecně lze říct, že pokud je hodnota korelačního koeficientu větší než 0,998, je závislost dvou proměnných považována za přijatelnou a uvažuje se, že hodnota analytu je v rozsahu linearity metody. Linearita se určuje řadou tří až šesti opakování s pěti nebo více standardy [58, 65].



Obrázek 26: Znázornění grafu pro stanovení linearity [57]

Rozsah se vztahuje k lineární části kalibrační křivky a závisí na účelu využití dané metody. Vyjadřuje v jakém koncentračním rozmezí analytů, bude graf stále lineární a metoda aplikovatelná. Toto koncentrační rozpětí je pak definováno jako rozsah metody, při němž by měla být metoda přesná. Velikost rozsahu analytické metody se bude lišit v závislosti na účelech využití dané metody. Obvykle se testuje rozsah $\pm 20\%$ cílové koncentrace. U metody s možnou přítomností nečistot při měření se využívá rozsah od 20% cílové koncentrace po limit kvantifikace [63, 66].

2.5.4 Limit detekce a kvantifikace

U limitů detekce a kvantifikace je nutné uvádět, jaké vzorce byly využity pro výpočet hodnot.

Limit detekce se stanoví analýzou vzorků o známé koncentraci analytu. Je to minimální úroveň koncentrace, při které je analyt spolehlivě detekován, ale nemusí být kvantifikován. ICH doporučuje několik postupů jak stanovit limit detekce: vizuální hodnocení, poměr signálu a

šumu, standardní odchylkou odezvy, standardní odchylkou sklonu linearity [63]. Výpočet pro limit je znázorněn v rovnici 3.

$$LOD = \frac{3,3 \cdot \delta}{S} \quad [3]$$

Limit kvantifikace je nejnižší koncentrace analytu, při které lze určit koncentraci neznámého vzorku. Tato hodnota je většinou spodní hranicí rozsahu metody a prvním bodem v kalibrační křivce. Doporučené metody stanovení limitu kvantifikace jsou stejné jako u limitu detekce. Výpočet pro limit kvantifikace je znázorněn v rovnici 4[63].

$$LOQ = \frac{10 \cdot \delta}{S} \quad [4]$$

2.5.5 Selektivita a specifita

Selektivita a specifita jsou někdy při validaci zaměňovány. **Specifita** je definována jako schopnost jednoznačného určení analytu i v přítomnosti interferujících látek. Specifita se testuje pomocí porovnávání vzorků obsahující nečistoty a vzorků bez nečistot. Tedy pokud máme specifickou metodu, můžeme za určitých podmínek určit složky analytu. **Selektivita** je definována pomocí ISO normy jako vlastnost měřicího systému se specifickými podmínkami, provádět kvantitativní měření pro jednu nebo více veličin, tak že měřené veličiny jsou nezávislé na jiných měřených veličinách a jiných látkách v analytu [57].

2.5.6 Správnost metody

Správnost metody je definována jako blízkost shody mezi naměřenou a skutečnou hodnotou veličiny. Je to kvalitativní charakteristika, která se vyjadřuje intervalem s rozmezím $\pm 15\%$ od skutečné hodnoty. Jednou z možností stanovení správnosti metody je porovnání výsledků změřené koncentrace a skutečné koncentrace vzorku. Druhým přístupem je porovnání výsledků získaných z nové metody s výsledky získanými z existující metody. Třetí možností je stanovení procentuálního výtěžku analytu se známou koncentrací na prázdné matrici. Vzorků by mělo být alespoň devět. Měly by být tři koncentrace o třech opakování [65, 66].

2.5.7 Robustnost

Nezbytnou součástí validace je robustnost, která je definována mírou schopnosti analytické metody zůstat stálá při úmyslných malých změnách podmínek metody a poskytuje záruku spolehlivosti během běžného použití. Změna podmínek může nastat při změně přístroje, laboratoře, analytika aj. Proměnné parametry jsou uvedeny v tabulce 1. Interval proměnných parametrů by měl být mírně větší než změny, které nastanou při využití metody. Testování robustnosti se provádí na konci validace metody [57, 62].

Tabulka 1: *Příklad proměnných parametrů pro stanovení robustnosti metody [57]*

Proměnný parametr	Změna
Kolona	Věk, značka, délka, šarže
Složení mobilní fáze	pH $\pm 0,05$, obsah organické fáze $\pm 2 \%$, jiný výrobce, gradientová eluce
HPLC přístroj	Jiná značka, jiný typ
Detekční vlnová délka	$\pm 2 \text{ nm}$
Teplota kolony	$\pm 5 \text{ }^{\circ}\text{C}$
Průtok	$\pm 0,05 \text{ ml/min}$

Robustnost se může testovat dvěma způsoby. První z nich je OFA (one factor at time). Tato technika mění postupně pouze jeden faktor a ostatní faktory zůstávají fixní. Tato technika je jednoduchá na provedení, ale je časově náročná. Druhou možností je měřit robustnost zkoumáním změny více faktorů důležitých pro analytický postup [64]. Základní myšlenka je nezkoumat jenom jednu změnu v parametru, ale několik změn najednou. Například A, B, C, D, E, F, G označují nominální hodnoty pro sedm různých faktorů, které by mohly ovlivnit výsledky, pokud se jejich nominální hodnoty změní. Alternativní hodnoty můžeme označit a, b, c, d, e, f, g. Ze všech kombinací bylo zvoleno osm, které mají rovnováhu mezi nominálními a alternativními hodnotami (viz Tabulka 2) a bylo provedeno osm měření. Výsledky stanovení jsou pak uvedeny malými písmeny s-z. Pro měření robustnosti pak stanovujeme retenční čas, tailing faktor, plochu píku, počet teoretických pater. Nejdříve byl vypočítán efekt dané změny parametru podle rovnice 5 [57, 58]. Následně byla vypočítána směrodatná odchylka za využití rovnice 6. Poté byla využita vypočítaná směrodatná odchylka k výpočtu standardní odchylky efektu dle rovnice 7. Nakonec byl stanoven interval spolehlivosti (rovnice 8) a standardizovaný efekt (rovnice 9). Interval spolehlivosti využívá k výpočtu studentův koeficient, který je stanoven podle hladiny významnosti (α) a stupňů volnosti. Robustnost je hypotézovým testem, kdy se předpokládá, že jednotlivé efekty budou nulové. Tato hypotéza je potvrzena pokud vyjde hodnota standardizovaného efektu menší než studentův koeficient [59, 67]. Druhou možností, jak určit, zda je parametr robustní je srovnání efektu s S_{efekt} vynásobeným studentovým rozdělovacím koeficientem. Pokud je hodnota efektu $>$ než vypočítaná hodnota, pak parametr není robustní [69].

$$Efekt = \frac{s + u + w + y}{4} - \frac{t + v + x + z}{4} \quad [5]$$

$$s = \sqrt{\frac{(r - p)^2 + (t - p)^2 + \dots + (z - p)^2}{m - 1}} \quad [6]$$

$$S_{\text{efekt}} = \sqrt{\frac{4S^2}{N}} \quad [7]$$

$$CI = Efekt \pm S_{\text{efekt}} \cdot t_{0,95;7} \quad [8]$$

$$SE = efekt/S_{\text{efekt}} \quad [9]$$

Tabulka 2: Znáznornění vybraných osmi měřených kombinací [62, 68]

Proměnný parametr	Jednotlivé kombinace parametrů							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Složení mobilní fáze	A	A	A	A	a	a	a	a
Výrobce mobilní fáze	B	B	b	b	B	B	b	b
Průtok mobilní fáze	C	c	C	c	C	c	C	c
Teplota na koloně	D	D	d	d	d	d	D	D
Objem nástřiku	E	e	E	e	e	E	e	E
Detekce	F	f	f	F	F	f	f	F
Kolona	G	g	g	G	g	G	G	g
Výsledek	s	t	u	v	w	x	y	z

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Používané přístroje a laboratorní vybavení

- Kapalinový chromatograf Agilent Infinity 1260
- Zařízení na výrobu ultračisté vody ELGA
- Analytické váhy
- Lednička s mrazničkou
- Ultrazvuková vodní lázeň
- Automatické pipety
- Vialky 2 ml
- Laboratorní sklo
- Injekční stříkačky 2 ml
- Membránové filtry, 0,45µm, Chromservis

3.2 Chemikálie

Název	Mr [g.mol ⁻¹]	Čistota	Výrobce	Země původu	CAS číslo
Oxytetracyklin	460,4	≥90,9 %	Sigma-Aldrich	USA	6153-64-6
Tetracyklin	444,43	≥ 98 %	Sigma-Aldrich	Izrael	60-54-8
Metanol	32,04	100 %	VWR	Francie	67-56-1
Metanol	32,04	≥ 99,9 %	Sigma-Aldrich	Německo	67-56-1
Acetonitril	41,05	100 %	VWR	USA	67-56-1
Acetonitril	41,05	≥ 99,69 %	Sigma-Aldrich	Německo	75-05-8
Kyselina trifluoroctová	961.70	p. a.	Lachesol	neznámé	76-05-1
Kyselina mravenčí	46,03	85 %	Lach-Ner, s.r.o.	Česká republika	64-18-6/1

3.3 Metoda pro stanovení oxytetracyklinu a tetracyklinu pomocí HPLC

3.3.1 Nastavení přístroje

Pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s DAD detektorem byly stanovovány standardy oxytetracyklinu a tetracyklinu. Podrobné informace o nastavení přístroje jsou shrnuty v tabulce 3. Pro separaci těchto dvou standardů byla využita izokratická eluce.

Tabulka 3: *Optimalizované podmínky kapalinové chromatografie*

Název přístroje	Agilent Infinity 1260
Objem nástřiku	5 μ l
Průtok mobilní fáze	0,6 ml/min
Složení mobilní fáze	MeOH:ACN:1 M TFA = 10:10:80
Název kolony	Kinetex EVO C18 (150x4,6 mm; 2,6 μ m)
Teplota na koloně	30 °C
Detektor	DAD
Vlnové délky detektoru	254 nm, 355 nm, 380 nm

3.3.2 Výběr kolony

Byl vybrán systém s reverzními fázemi, kde byly nejméně zadržovány polární látky a látky nepolární mají nejvyšší retenci (kapitola 2.4.2.6). V literatuře je popsáno využití kolony C8 [69], tato kolona nebyla během zpracování diplomové práce k dispozici, a tak byla jako náhradní kolona vybrána kolona C18 (Kinetex EVO C18 150x4,6 mm; 5 μ m). Kolonu C18 využili ve své práci J. W. Fritze a Y. Zuo z roku 2007 [70]. Tato kolona má účinnost separace v rozmezí pH 1-12. Tedy kolona je poměrně robustní a díky vysokému pracovnímu rozsahu pH bylo možné využití k úpravě mobilní fáze kyselinu trifluoroctovou. Jako alternativní kolona pro ověření robustnosti metody byla vybrána Kinetex XB-C18 150x4,6mm; 5 μ m. Teplota termostatu kolony byla nastavena na 30°C.

3.4 Příprava roztoků standardů

3.4.1 Příprava zásobního roztoku

Zásobní roztok byl připraven o koncentraci 1 g.l⁻¹, ze kterého byly ředěním připravovány pracovní roztoky. Navážka oxytetracyklinu a tetracyklinu, která činila 0,025 g, byla kvantitativně převedena do odměrné baňky o objemu 25 ml a doplněna roztokem mobilní fáze pro ředění po rysku. Poté byl roztok umístěn do ultrazvukové vodní lázně na 10 minut, aby došlo k rychlému rozpuštění standardů.

3.4.2 Stanovení linearitu

Linearita byla stanovena pomocí pěti kalibračních bodů o koncentraci: 100; 50; 10; 1; 0,1 mg.l⁻¹. Tyto roztoky byly přefiltrovány přes mikrofiltr do 2 ml vialek a vloženy do autosampleru chromatografu a analyzovány. Standardy byly analyzovány ve třech opakováních a výslední hodnota plochy píku byla zprůměrována. Vyhodnocení bylo provedeno pomocí sestavení grafu závislosti plochy píku na koncentraci standardů. Takto získané body byly proloženy křivkou lineární regrese a linearita metody byla posuzována dle korelačního koeficientu. Během každého měření byly získávány spektra standardů.

3.4.3 Stanovení limitu kvantifikace a detekce

Pro stanovení meze detekce a kvantifikace bylo připraveno šest standardů o koncentraci $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ zředěním zásobního standardu. Roztoky byly přefiltrovány přes mikrofiltr a byly analyzovány. Limity detekce a kvantifikace byly vypočítány dle postupu uvedeného v kapitole 2.5.4.

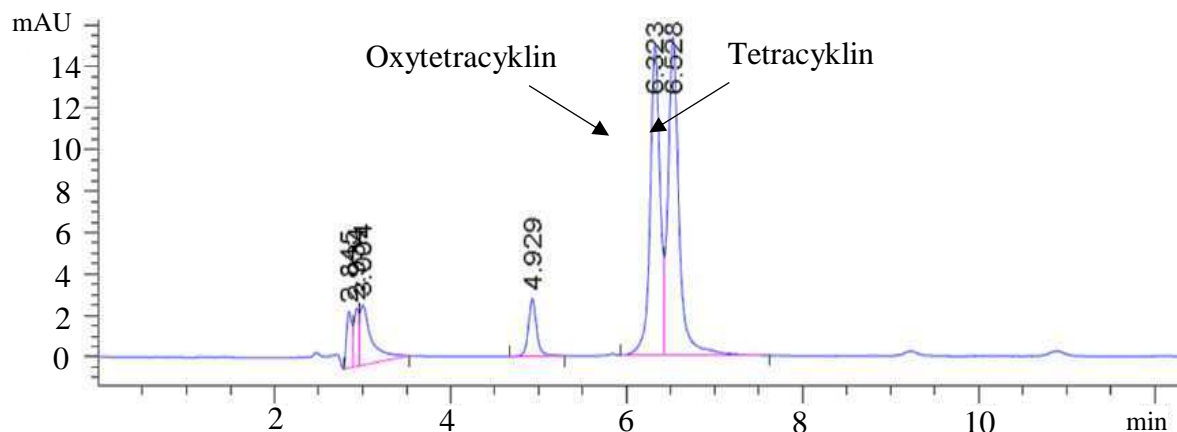
3.4.4 Stanovení robustnosti metody

Byly připraveny standardy o koncentraci 5 mg.l^{-1} podle náležitostí jednotlivých parametrů metody naředěním zásobního roztoku standardů. Bylo vybráno osm parametrů, které se měnily v osmi různých kombinacích, jak je uvedeno v kapitole 2.5.7. Po každé analýze na kapalinovém chromatogramu byla metoda upravena podle tabulky 2.

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

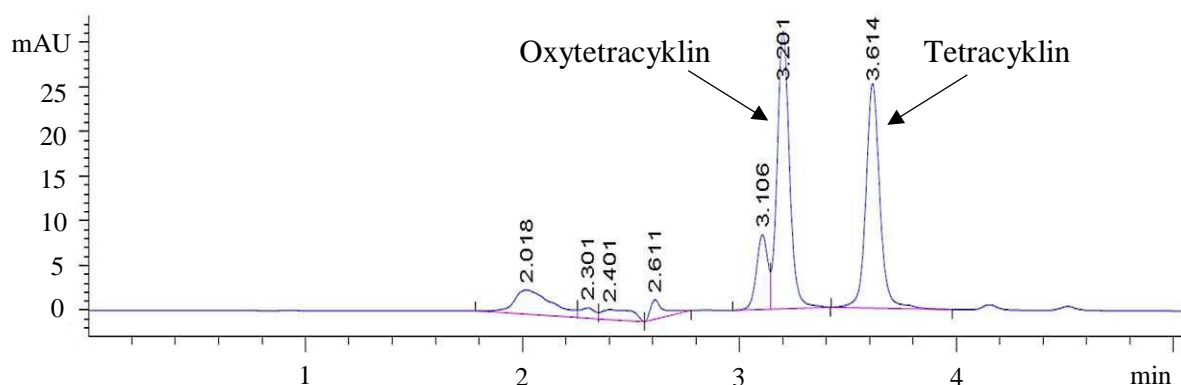
4.1 Optimalizace složení mobilní fáze

Na základě dostupné literatury byly vybírány vhodné složky mobilní fáze a byla zvolena izokratická eluce. Jako základ mobilní fáze byl vybrán metanol a 1% kyselina mravenčí v poměru 20:80. Průtok byl nastaven na 0,3 ml/min a nástřik byl 5 μ l. Na obrázku 27 je patrné, že separace tetracyklinu a oxytetracyklinu ve směsném standardu byla nevyhovující. Analýza byla však poměrně rychlá, jelikož metanol je nejsilnější eluční činidlo v systému reverzních fází.



Obrázek 27: Chromatogram směsi standardu tetracyklinu a oxytetracyklinu při využití mobilní fáze složené z metanolu a 1% kyseliny mravenčí = 20:80

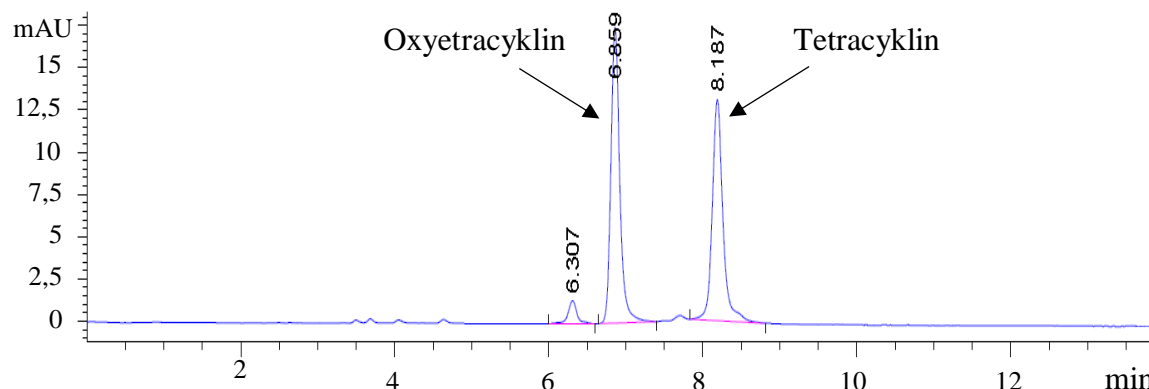
J. W. Fritz a Y. Zuo ve své práci ke zlepšení separaci tetracyklinu a oxytetracyklinu využili směs mobilní fáze acetonitrilu, metanolu a okyselující složky v poměru 15:5:80, přičemž průtok mobilní fáze byl 0,6 ml/min [70]. Objem nástřiku vzorku činil 5 μ l. Úprava pH byla provedena 1% kyselinou mravenčí. Tímto postupem bylo docíleno dobré separace tetracyklinu a oxytetracyklinu, avšak u oxytetracyklinu se nepodařilo oddělit nečistoty obsažené ve standardu (Obrázek 28).



Obrázek 28: Chromatogram směsi standardu tetracyklinu a oxytetracyklinu při využití mobilní fáze acetonitril: metanol: 1% kyselina mravenčí = 15:5:80

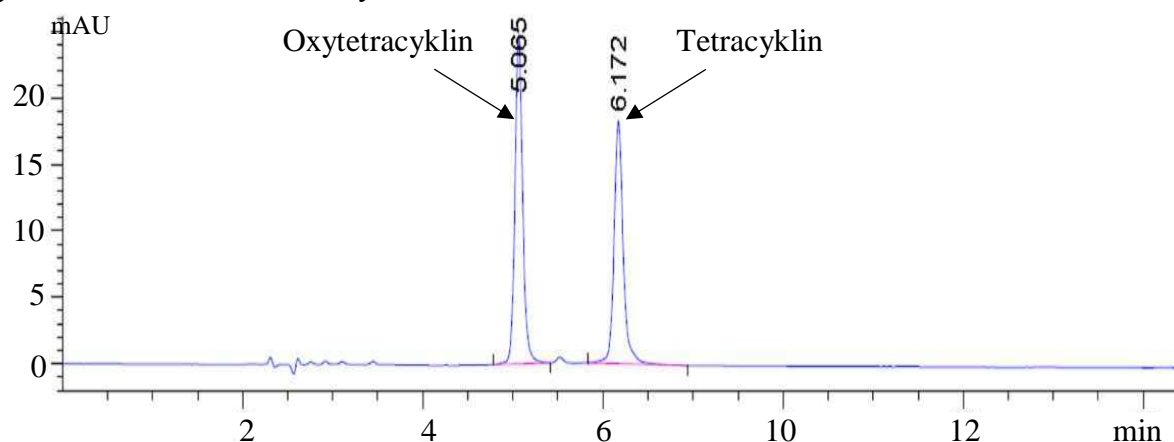
V další fázi měření byla kyselina mravenčí nahrazena 0,01M kyselinou trifluoroctovou (TFA) a bylo upraveno složení mobilní fáze v poměru

0,01M TFA:ACN:MeOH = 80:10:10. Za těchto podmínek došlo k optimální separaci bez vedlejších rušivých jevů a zvýšení retenčních časů (Obrázek 29).



Obrázek 29: Chromatogram při využití mobilní fáze acetonitril: metanol: 0,01 M kyselina trifluoroctová = 10:10:80.

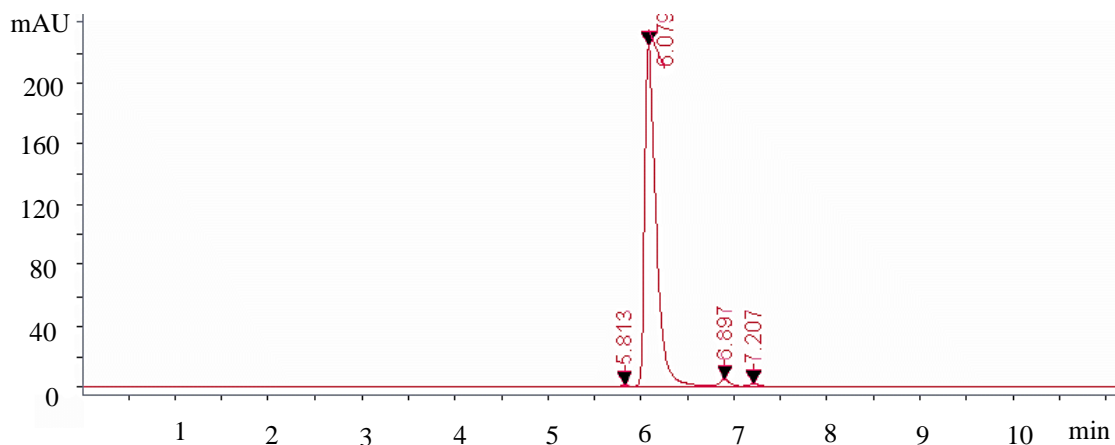
Pro zrychlení analýzy byl dále změněn poměr rozpouštědel v mobilní fázi. Podle (Obrázek 16) má metanol větší eluční sílu, a proto byl poměr změněn ve prospěch metanolu na 80:5:15 (0,01M kyselina trifluoroctová: acetonitril: metanol). Po této úpravě mobilní fáze nebyla neznámá látka zaznamenána v chromatogramu (Obrázek 30). Lze předpokládat, že nedošlo k separaci neznámé látky a standardu. Z těchto důvodů tento poměr mobilní fáze nebyl vyžit a složení mobilní fáze bylo nastaveno na 80:10:10.



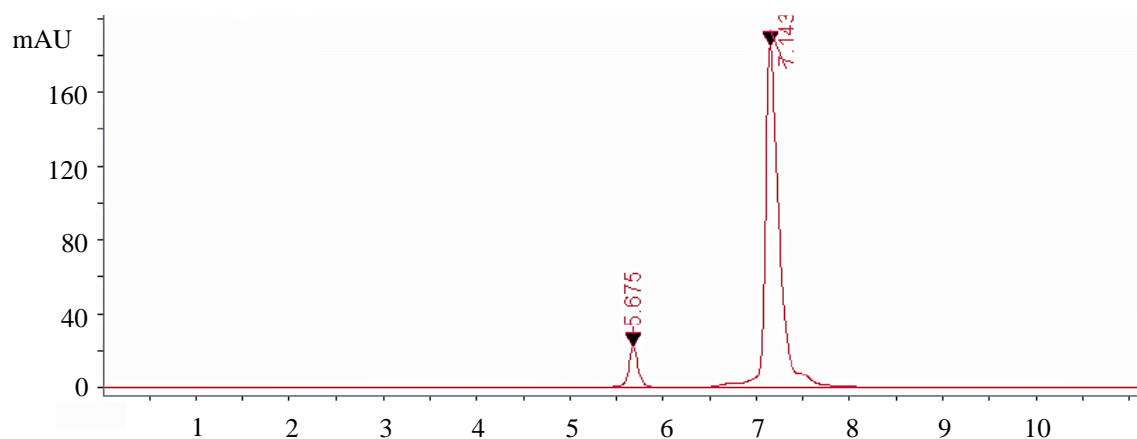
Obrázek 30: Chromatogram směsi standardu tetracyklinu a oxytetracyklinu při využití mobilní fáze acetonitril: metanol: 0,01 M kyselina trifluoroctová = 5:15:80

4.2 Charakterizace sledovaných standardů

Celá metoda byla optimalizována se směsí standardů. Proto bylo nutné určit retenční čas jednotlivých antibiotik. Byly připraveny roztoky jednotlivých standardů a analyzovány. Retenční čas oxytetracyklinu byl 6,079 minut (Obrázek 31) a tetracyklinu 7,143 minut (Obrázek 32). Z těchto retenčních časů bylo určeno, že při měření směsi standardů je v chromatogramech prvním píkem oxytetracyklin, který je eluován rychleji, a druhým píkem je tetracyklin, který je více zadržován na koloně. Toto stanovení bylo také ověřeno analýzou směšného standardu o různé koncentraci tetracyklinu a oxytetracyklinu a porovnáním absorpčních spekter látek.



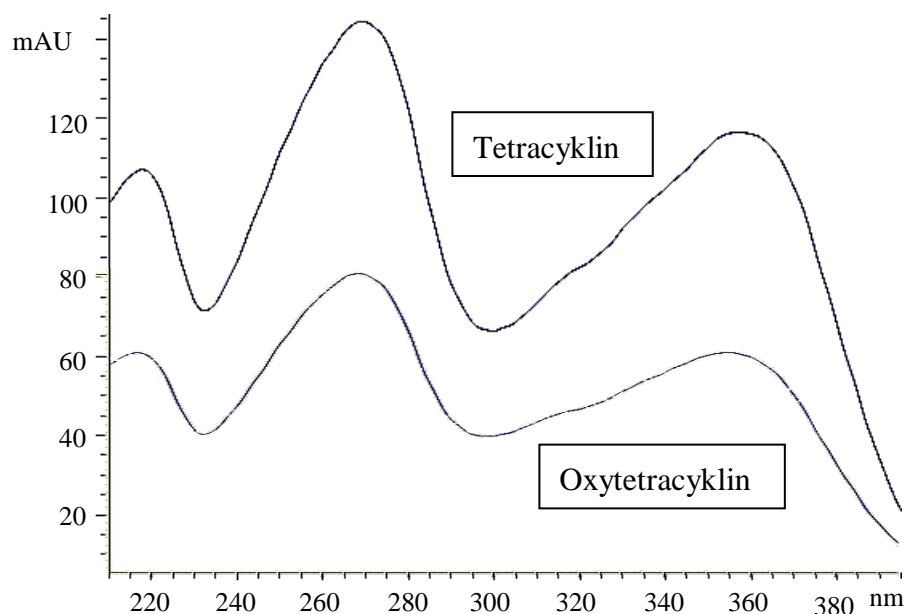
Obrázek 31: Chromatogram standardu oxytetracyklinu



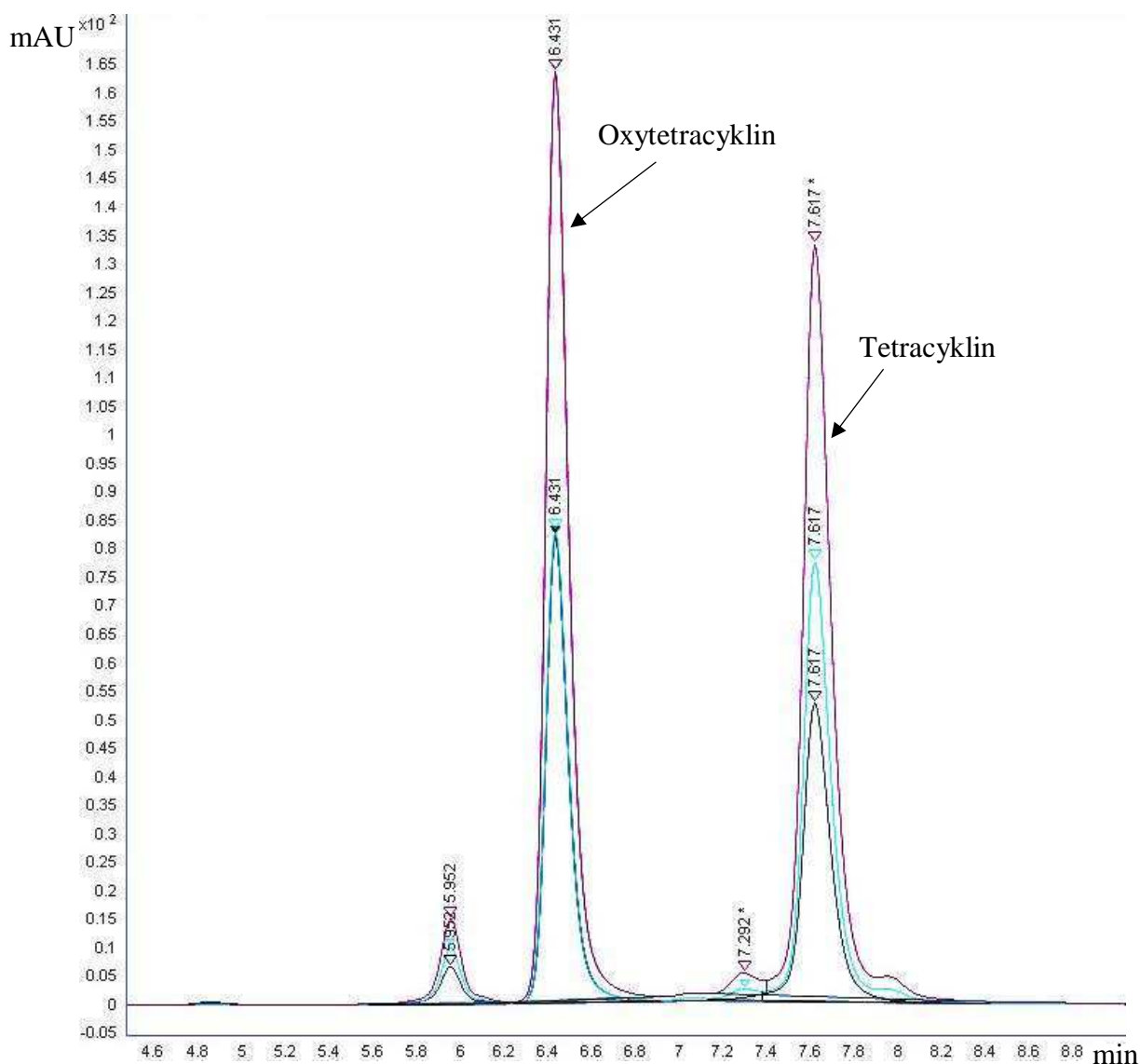
Obrázek 32: Chromatogram standardu tetracyklinu

4.3 Výběr vhodné vlnové délky pro detekci

Pro určení nejvhodnější vlnové délky pro detekci bylo změřeno absorpční spektrum standardů tetracyklinu a oxytetracyklinu (Obrázek 33). Naměřená spektra jsou si velmi podobná a odlišují se především v intenzitě, jelikož standardy mají téměř stejnou chemickou strukturu (Obrázek 11 a Obrázek 12). Pro metodu byly vybrány tři vlnové délky v absorpčních maximech standardů: 254 nm, 355 nm a 380 nm (Obrázek 34).



Obrázek 33: Absorpční spektrum tetracyklinu a oxytetracyklinu, naměřené na DAD detektoru



Obrázek 34: Detekce směsného standardu o koncentraci 100 mg/l. Černá linie značí chromatogram pro vlnovou délku 254 nm, modrá linie je pro vlnovou délku 380 nm a červená linie značí vlnové délky 355 nm

4.4 Validace metody

Validace metody byla provedena pro standardy oxytetracyklinu a tetracyklinu. Validační parametry pak byly zpracovány pro každý analyt zvlášť. Stanovena byla linearita, počet teoretických pater a výška teoretických pater, kapacitní faktor, relativní retence, rozlišení, tailing faktor, relativní standardní odchylka, přesnost metody, limit detekce a kvantifikace, robustnost a rozlišení.

4.4.1 Optimalizace v rámci validace metody

Optimalizace systému je nezbytná pro vytvoření kvalitní metody. V rámci optimalizace byly stanoveny parametry: počet teoretických pater, kapacitní faktor, tailing faktor, relativní retenční faktor a rozlišení (Tabulka 4).

Tabulka 4: *Vypočítané hodnoty pro parametry optimalizace metody*

λ [nm]	Oxytetracyklin			Tetracyklin		
	254	355	380	254	355	380
Počet teoretických pater (N) [-]	19102	19334	19334	20534	20338	20534
Výška teoretických pater (H) [cm]	0,000785	0,000776	0,000776	0,000730	0,000738	0,000730
Kapacitní faktor (K') [-]	2,049	1,805	1,810	2,618	2,328	2,334
Tailing faktor (T) [-]	1,2469	1,2727	1,2836	1,0585	1,1250	1,0824

λ [nm]	T_m [min]	$T_r - ox$ [min]	$T_r - tet$ [min]	Relativní retenční faktor (α) [-]	Rozlišení (R_s) [-]
254	2,312	6,501	7,714	1,278	5,903
355	2,318	6,501	7,714	1,290	5,917
380	2,313	6,500	7,712	1,290	5,917

Počet teoretických pater byl vypočítán podle vzorce na obrázku 21. Hodnoty pro výpočet byly vzaty z protokolu o analýze měření. Počet teoretických pater se liší v závislosti na koloně a na analytu, ale nezávisí na koncentraci analytu. Tedy pro tetracyklin a oxytetracyklin se účinnost kolony může lišit. Čím větší je počet teoretických pater, tím dochází k menšímu rozmývání analytu na koloně a tím užší je pík. Počet teoretických pater by pak měl být >2000 [57]. Použitá kolona tuto podmínku splňuje (19102–20534). Z toho vyplývá, že účinnost kolony pro metodu je dostatečná. Také je z výsledků (Tabulka 4) očividné, že počet teoretických pater se příliš neliší s vlnovou délkou. Je patrné, že účinnost separace je velmi podobná jak pro tetracyklin, tak pro oxytetracyklin, zde hraje důležitou roli podobnost chemické struktury a vlastností obou antibiotik. To lépe znázorňuje výška teoretického patra, která se vypočítá podle rovnice 10. Čím menší hodnota výšky patra je, tím účinnější je kolona.

$$H = L/N \quad [10]$$

Kapacitní faktor udává, do jaké míry je analyt zadržován stacionární fází. Tedy čím větší je kapacitní faktor, tím je analyt na koloně více zadržován a je eluován později. Kapacitní faktor byl vypočítán podle obrázku 22. Z výsledků (Tabulka 4) je patrné, že oxytetracyklin je méně zadržován a je eluován první před tetracyklinem.

Tailing faktor určuje asymetrii píku. Čím je hodnota větší, tím dochází ke snížení přesnosti kvantifikace, jelikož je čím dál obtížnější integrace píku. Nejideálnější je hodnota ≈ 1 a měla by být < 2, pak má pík tvar Gaussovy křivky a lze přesně určit plochu píku. Jak vyplývá z tabulky 4, metoda tento parametr splňuje a píky tetracyklinu a oxytetracyklinu měli tailing faktor < 2.

Relativní retenční faktor vyjadřuje relativní vzdálenost dvou píků. Vyšší hodnota retenčních faktorů ukazuje na lepší separaci standardů. Hodnota by měla být > 1 [57]. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 4. Retenční faktory tetracyklinu i oxytetracyklinu při použití

optimalizované metody tuto podmínku splňují, hodnoty relativního retenčního faktoru se pohybovali od 1,278 do 1,290

Rozlišení podává informaci o tom, jak dobře proběhla separace látek. Aby mohla být kvantifikace provedena správně, musí mít dva nejbližší píky hodnotu rozlišení > 2 [57]. Jak je uvedeno v tabulce 4 hodnota rozlišení byla přibližně 5,9 a podmínka pro správnou separaci byla splněna.

4.4.2 Přesnost metody (precision)

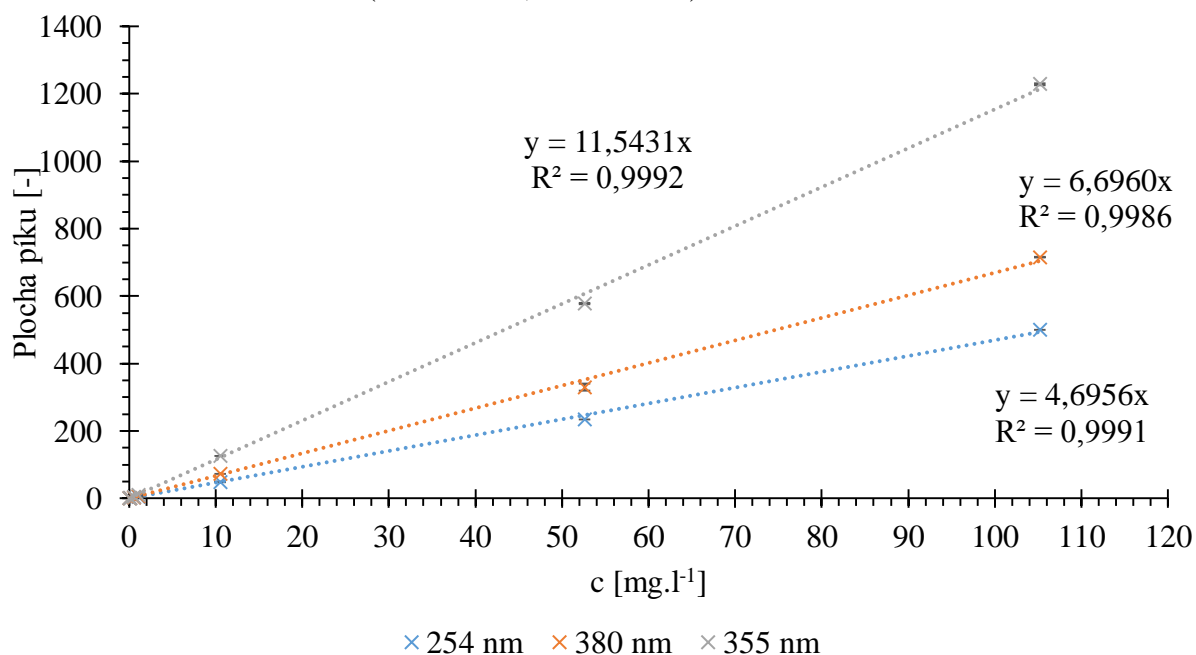
Relativní standardní odchylka (RSD) vyjadřuje procentuální rozptýlení hodnot od aritmetického průměru. Označuje přesnost HPLC chromatografu (kolony, podmínky, čas, aj.). Příprava vzorku pak neovlivňuje výslednou hodnotu. Správně by měla být hodnota směrodatné odchylky $< 5 \%$ [63]. Optimalizovaná metoda tuto podmínku splňuje (Tabulka 5).

Tabulka 5: RSD pro tetracyklin a oxytetracyklin o koncentraci 1 mg.l^{-1}

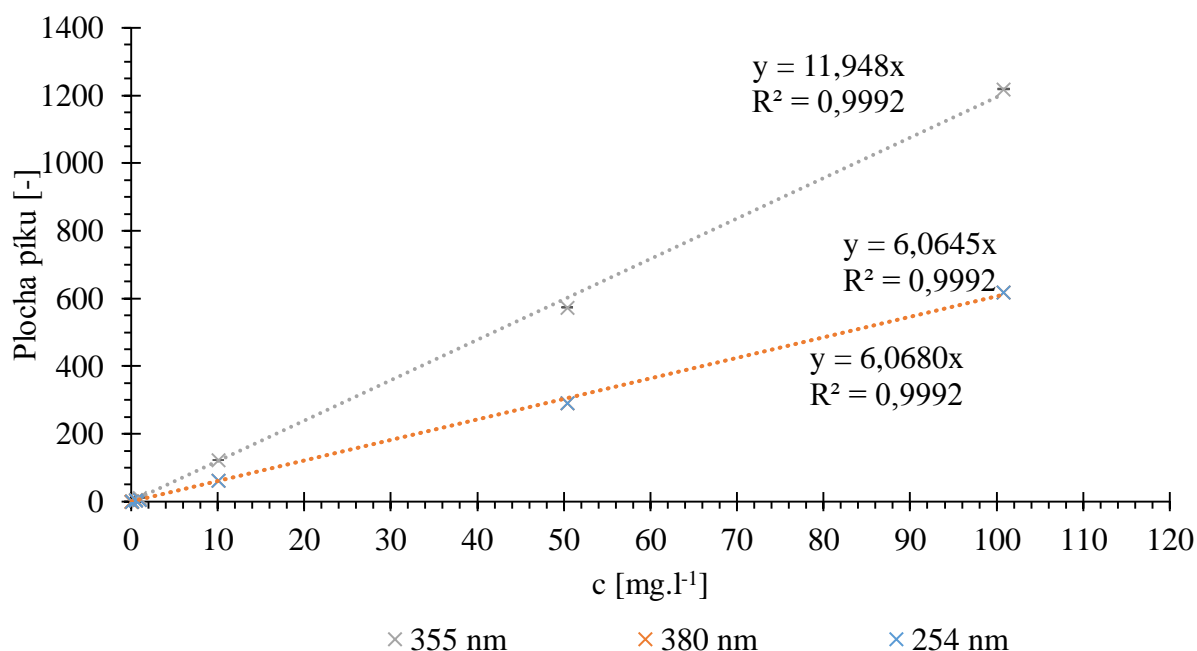
λ [nm]	Oxytetracyklin			Tetracyklin		
	254	380	355	254	380	355
RSD [%]	2,5698	2,5569	0,5922	2,9563	2,4956	2,2190

4.4.3 Linearita

Linearita byla stanovena pomocí standardů o 6 různých koncentrací (100; 50; 10; 1; 0,5; 0,1 mg/l). Do grafu byly vyneseny hodnoty plochy píků v závislosti na koncentraci analytů. Vzniklé body byly proloženy lineární regresí procházející nulovou hodnotou, čímž byly sestrojeny kalibrační přímky. Hodnoty všech korelačních koeficientů byly větší než 0,998. Na základě naměřených výsledků lze konstatovat, že zkoumaná metoda je lineární v měřeném rozsahu (Obrázek 35, Obrázek 36).



Obrázek 35: Lineární závislost plochy píku při třech různých vlnových délkách na koncentraci tetracyklinu ve směsi



Obrázek 36: Lineární závislost plochy píku na koncentraci oxytetracyklinu ve směsi při třech různých vlnových délkách.

4.4.4 Mez detekce a kvantifikace

Meze detekce a kvantifikace byly stanoveny na základě poměrů signálu k šumu. Hodnoty limitu detekce byly vypočítány podle rovnice 3. Z výsledků je patrné, že mez detekce testovaných látek se liší v závislosti s vlnovou délkou pro detekci. Nejnižší limity detekce byly naměřeny pro vlnovou délku 355 nm, jelikož při této vlnové délce dochází k největší absorpci záření tetracyklinem a oxytetracyklinem.

Limit kvantifikace byl stanoven podle rovnice 4. Jeho hodnota by měla být stejná nebo vyšší než limit detekce, jelikož na této hladině koncentrace musíme být schopni určit množství měřeného analytu. Tuto podmínku výsledky splňují. Můžeme vidět, že hodnoty limitu kvantifikace a detekce spolu korelují. Tedy z tabulky 6 je patrné, že nevhodnější vlnovou délkou je 355 nm pro tetracyklin i oxytetracyklin.

Tabulka 6: Hodnoty meze detekce pro jednotlivé vlnové délky

λ [nm]	Limit detekce [mg.l ⁻¹]		Limit Kvantifikace [mg.l ⁻¹]	
	Oxytetracyklin	Tetracyklin	Oxytetracyklin	Tetracyklin
254	0,0434	0,0764	0,1447	0,2549
380	0,0552	0,0668	0,1841	0,2225
355	0,0246	0,0344	0,0821	0,1147

Maximální přípustná koncentrace tetracyklinu a oxytetracyklinu v mléce je podle platné legislativy (kapitola 2.3) 0,1 mg.l⁻¹. Reálně lze ve vzorcích mléka očekávat nižší koncentrace těchto látek. Přímá analýza těchto látek by tedy pravděpodobně za použití popsané metody nebyla možná. Pro analýzu vzorků mléka na HPLC je nutné upravit matici vzorku, popřípadě provést prekoncentraci stanovovaných látek. Zkoumaná metoda byla vyvinuta pro analýzu

sorpčních gelů z techniky DGT. Technika DGT plní obě výše zmíněné funkce, to umožňuje separaci analytů od složité matrice a zároveň prekoncentruje analyty v sorpčním gelu. V případě sledovaných antibiotik se předpokládá eluce sorpčního gelu v roztoku acetonitrilu a díky prekoncentraci antibiotik v sorpčním gelu by stanovené LOD mělo postačit pro analýzu eluátu z techniky DGT.

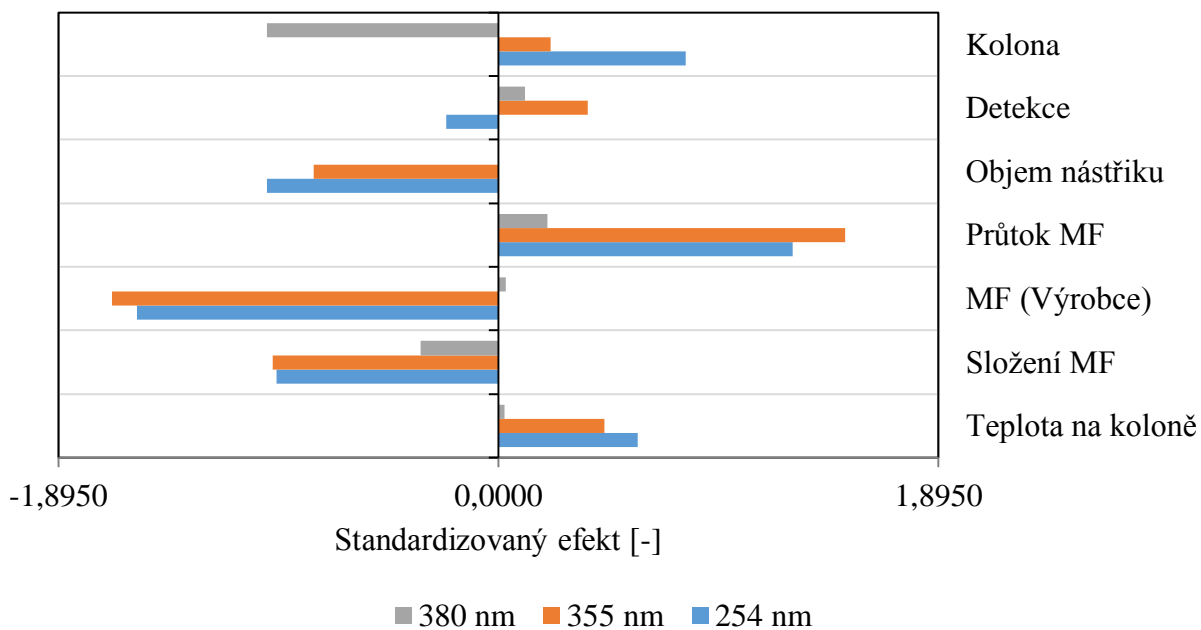
4.4.5 Robustnost

Nezbytnou součástí validace metody je robustnost. Robustnost byla testována, aby bylo zjištěno, jaké parametry a jejich případné změny mají vliv na spolehlivost metody. Pro stanovení robustnosti této metody byly využity proměnné parametry – složení mobilní fáze, výrobce mobilní fáze, teplota termostatu kolony, průtok mobilní fáze, objem nástřiku, vlnová délka detekce a kolona. Bylo využito osm kombinací proměnných parametrů pro jednotlivá měření (Tabulka 2). Pro jednotlivá měření byly připraveny roztoky standardů o koncentraci 5 mg.l⁻¹. V rámci hodnocení robustnosti byl sledován vliv proměnných parametrů za využití standardizovaného efektu na stanovení koncentrace standardu, plochy píku, počtu teoretických pater, tailing faktoru a retenčního času. Standardizovaný efekt byl vypočítán postupem z kapitoly 2.5.7 a studentův koeficient (1,8950) byl zvolen pro 7 stupňů volnosti a hladinu významnosti (α) 0,05.

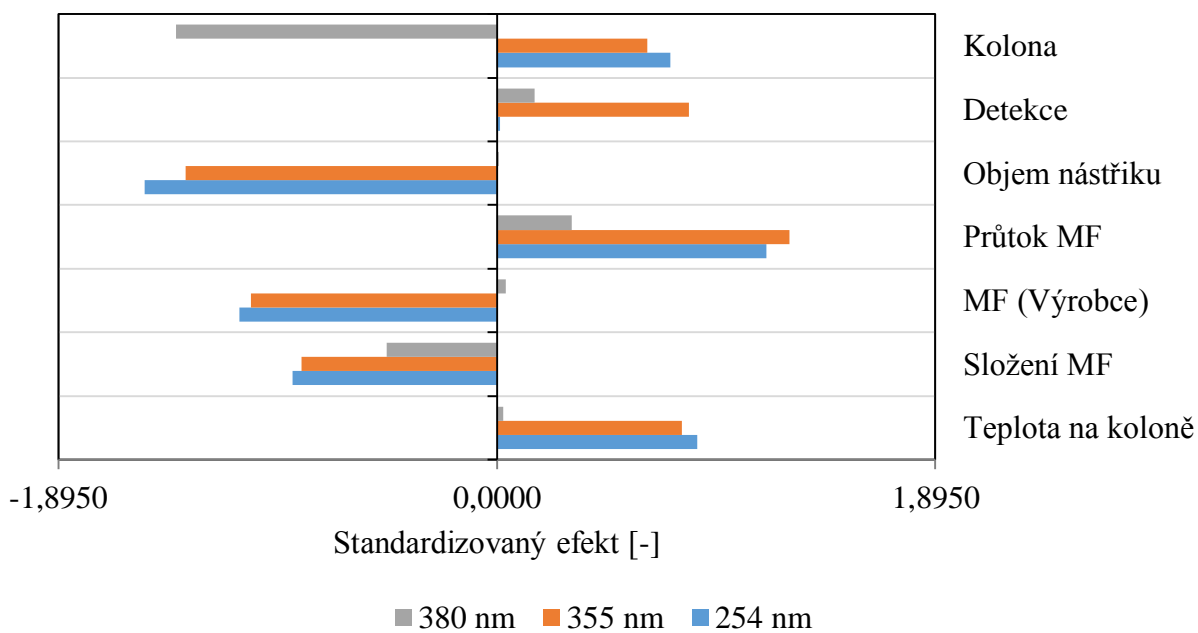
Tabulka 7: Vybrané proměnné parametry pro testování robustnosti

Proměnný parametr	Označení nominálních hodnot	Původní nastavení metody	Označení alternativních hodnot	Alternativní nastavení metody
složení MF (0,01 M TFA:ACN:MeOH)	A	80:10:10	a	82:09:09
Výrobce mobilní fáze	B	Sigma-Aldrich	b	VWR
Teplota na koloně	C	30 °C	c	33 °C
Průtok mobilní fáze	D	0,6 ml/min	d	0,7 ml/min
Objem nástřiku	E	5 µl	e	6 µl
Detekce	F	254/355/380	f	256/357/382
Kolona	G	EVO C18	g	XB-C18

Vypočítané standardizované efekty prokázaly, že změny parametrů nemají významný vliv na určení plochy píku oxytetracyklinu a tetracyklinu. Z obrázku 37 je patrné, že u tetracyklinu došlo k největšímu ovlivnění plochy píku při změně výrobce mobilní fáze u vlnových délek 254 a 355 nm. Při využití vlnové délky 380 nm pro detekci bylo největší ovlivnění plochy píku způsobeno změnou kolony. Z obrázku 38 je patrné, že stanovení plochy píku u oxytetracyklinu bylo nejvíce ovlivněno změnou objemu nástřiku. Stejně jako u tetracyklinu se však míra ovlivnění liší při využití vlnové délky 380 nm, kde má největší vliv změna kolony. Nicméně, žádná hodnota standardizovaného efektu nepřesahuje hodnotu studentova koeficientu (1,8950).

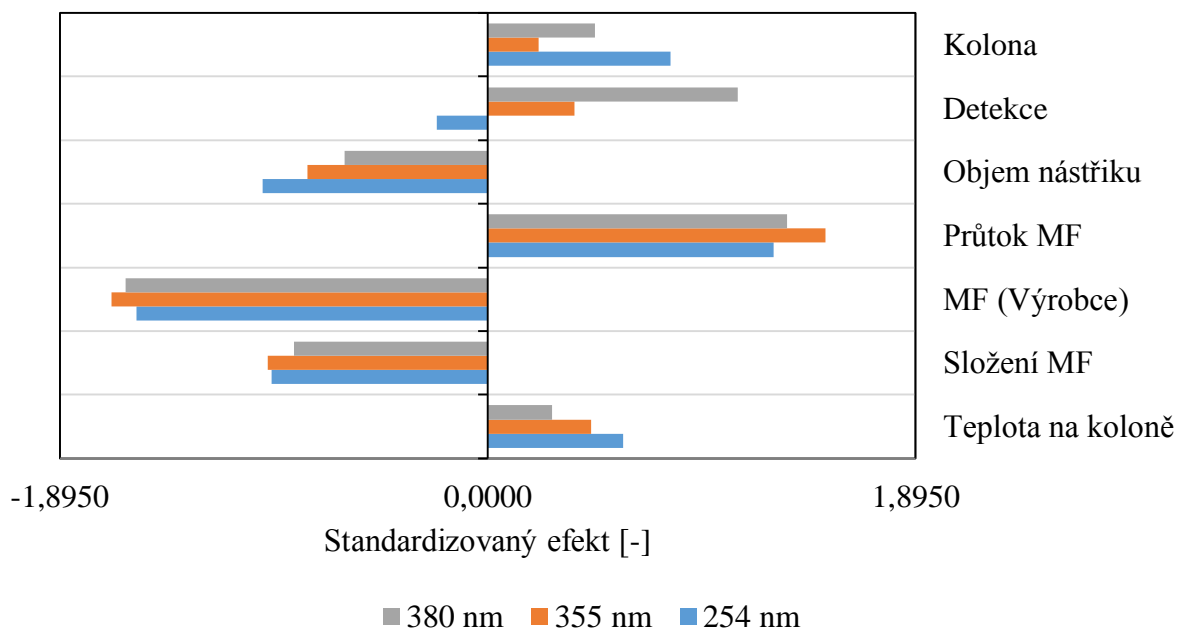


Obrázek 37: Jednotlivé parametry a jejich vliv na plochu píku tetracyklinu

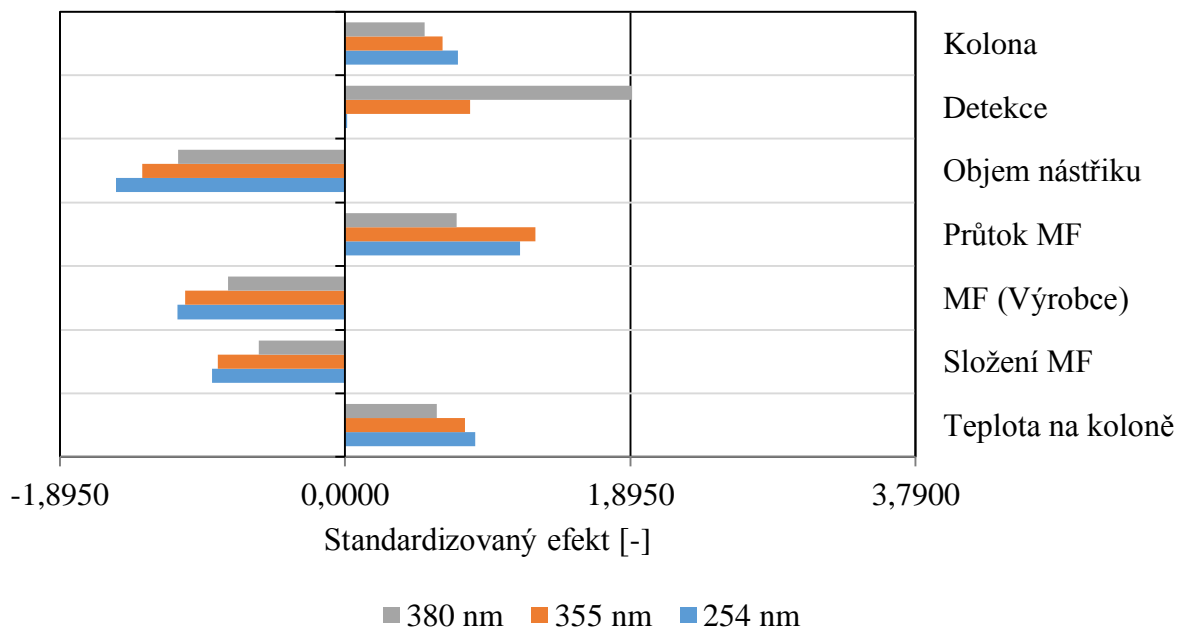


Obrázek 38: Jednotlivé parametry a jejich vliv na plochu píku oxytetracyklinu

Z hlediska efektů jednotlivých parametrů na stanovení koncentrace jednotlivých standardů jsou si grafy velmi podobné svým průběhem (Obrázek 39 a Obrázek 40). Nicméně pro koncentraci tetracyklinu je metoda robustní při všech měřených vlnových délkách, zatím co pro oxytetracyklin je metoda robustní při vlnových délkách 254 nm a 355 nm (Obrázek 39). V případě detekce oxytetracyklinu při vlnové délce detekce 380 nm byla nejméně robustní právě změna vlnové délky o 2 nm, což zvýšilo hodnotu standardizovaného efektu nad studentův koeficient (Obrázek 40). Největší vliv na stanovení tetracyklinu má změna výrobce mobilní fáze. Avšak tento parametr nedosahuje studentova koeficientu.



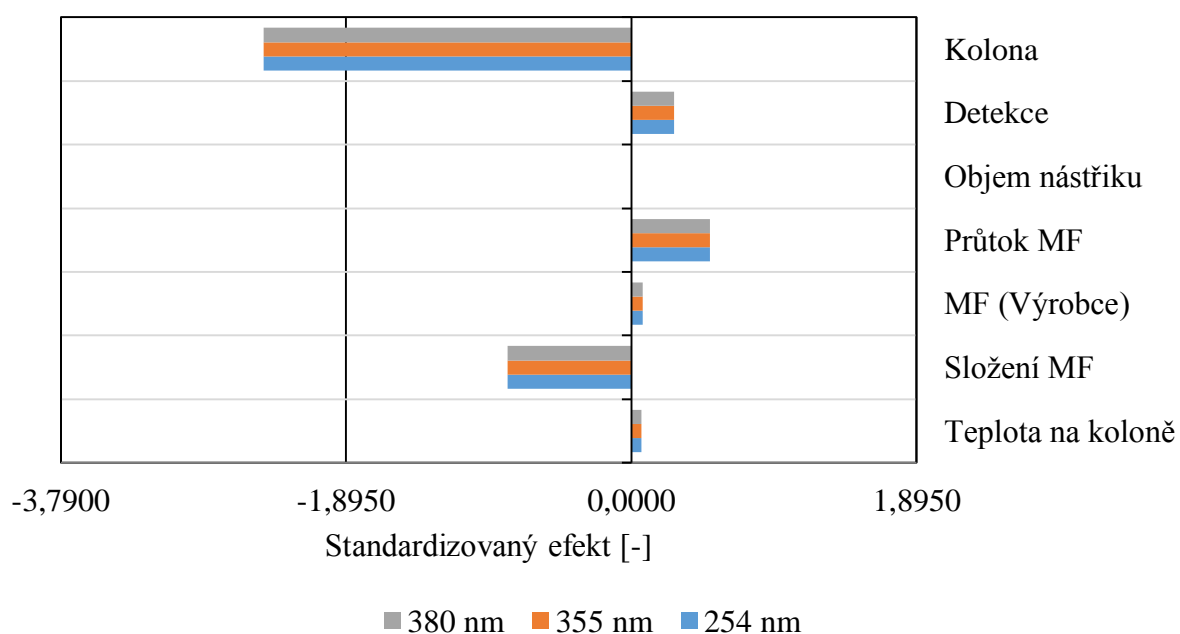
Obrázek 39: Jednotlivé parametry a jejich vliv na koncentraci tetracyklinu



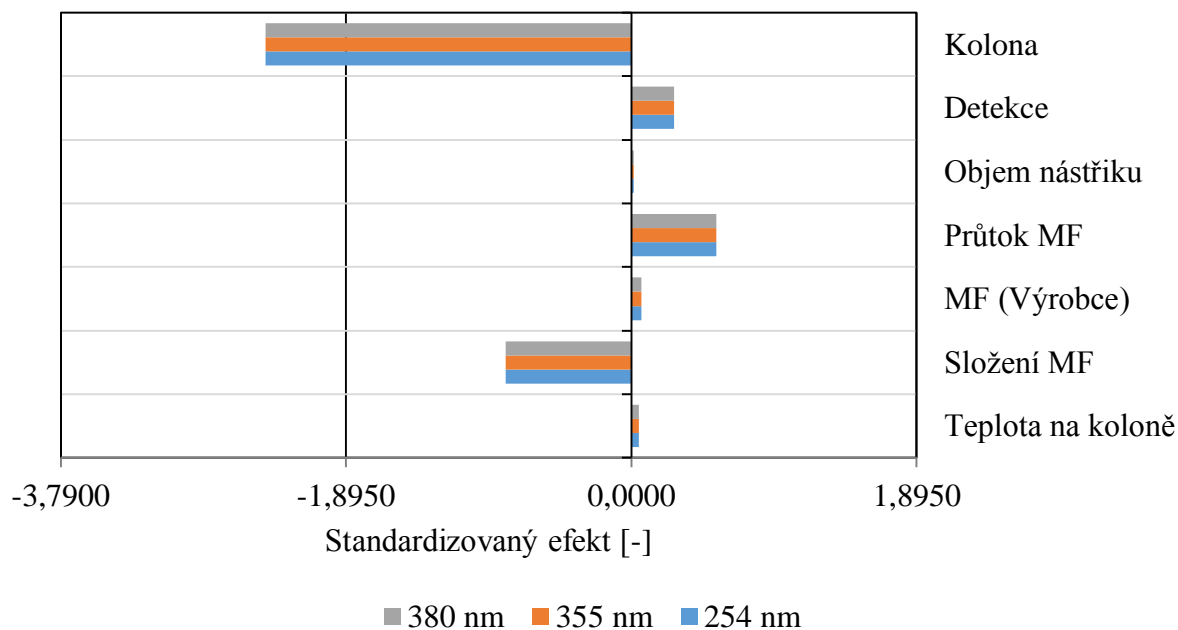
Obrázek 40: Jednotlivé parametry a jejich vliv na koncentraci oxytetracyklinu

Retenční časy oxytetracyklinu a tetracyklinu byly významně ovlivněny změnou kolony a byly posunuty v průměru o 7 minut. V obou dvou případech byla hodnota standardizovaného efektu 2,4286 pro oxytetracyklin a 2,4411 pro tetracyklin a tím pádem jsou obě hodnoty větší než studentův koeficient, který je 1,8950 (Obrázek 41 a Obrázek 42). Ačkoliv kolony mají stejnou délku a velikost částic náplně kolon XB-18 a EVO-C18 se odlišují v uspořádání stacionární fáze, což může vést změnám retenčních časů. Kolona EVO-C18 má endcapovanou stacionární fázi a není porézní, obě vlastnosti významně zrychlují metodu při využití této kolony.

Žádný další parametr neměl statisticky významný vliv na průběh metody. Při snížení obsahu metanolu a acetonitrilu (organické složky) v mobilní fázi, došlo ke zvýšení retenčních časů, neboť eluční síla mobilní fáze byla nižší. Tento jev se projevil už u optimalizace metody. Opačný efekt na retenční čas měly změny rychlosti průtoku mobilní fáze a vlnové délky při detekci.

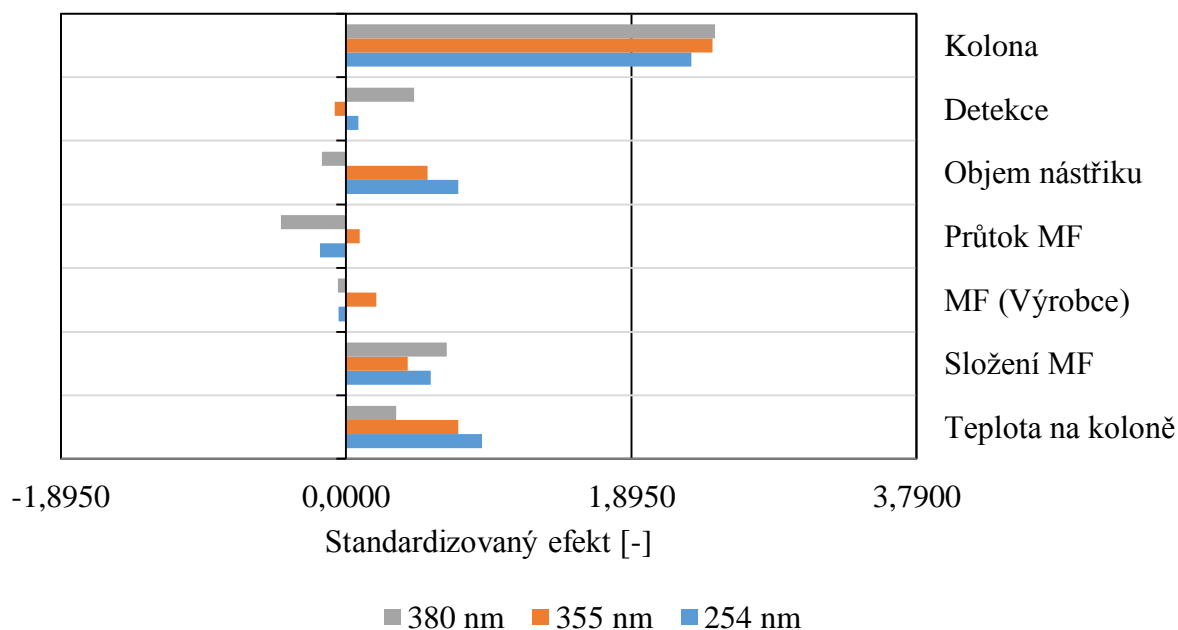


Obrázek 41: Jednotlivé parametry a jejich vliv na retenční čas tetracyklinu

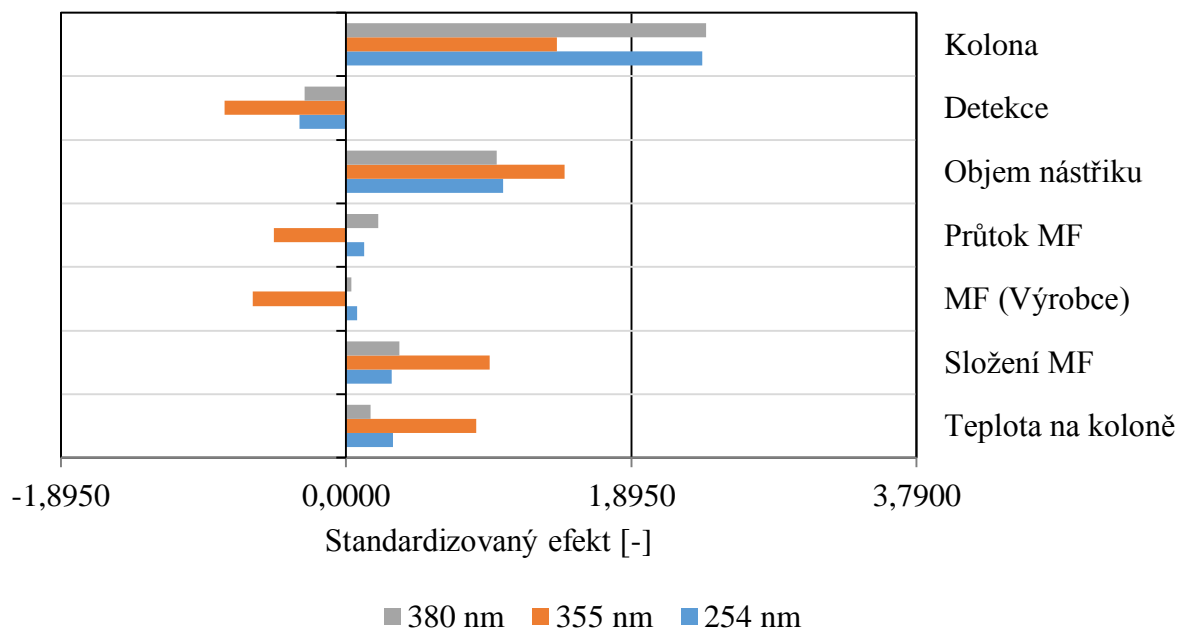


Obrázek 42: Jednotlivé parametry a jejich vliv na retenční čas oxytetracyklinu

Významný vliv na tailing faktor oxytetracyklinu a tetracyklinu má změna kolony. Přestože byla zvolena kolona se stacionární fází C18, došlo k významnému snížení hodnoty tailing faktoru kromě vlnové délky 355 nm u oxytetracyklinu, kde standardizovaný efekt nedosahoval hodnoty studentova koeficientu. To je způsobeno odlišným uspořádáním stacionární fáze kolony EVO-C18 a XB-C18.

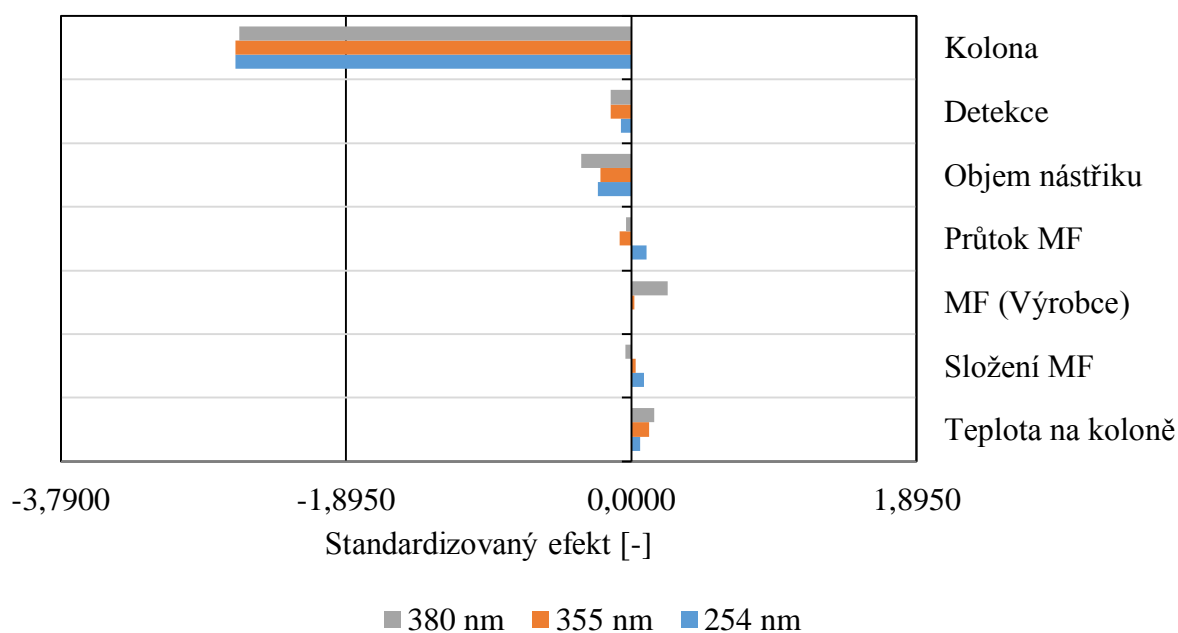


Obrázek 43: Jednotlivé parametry a jejich vliv na tailing faktor tetracyklinu

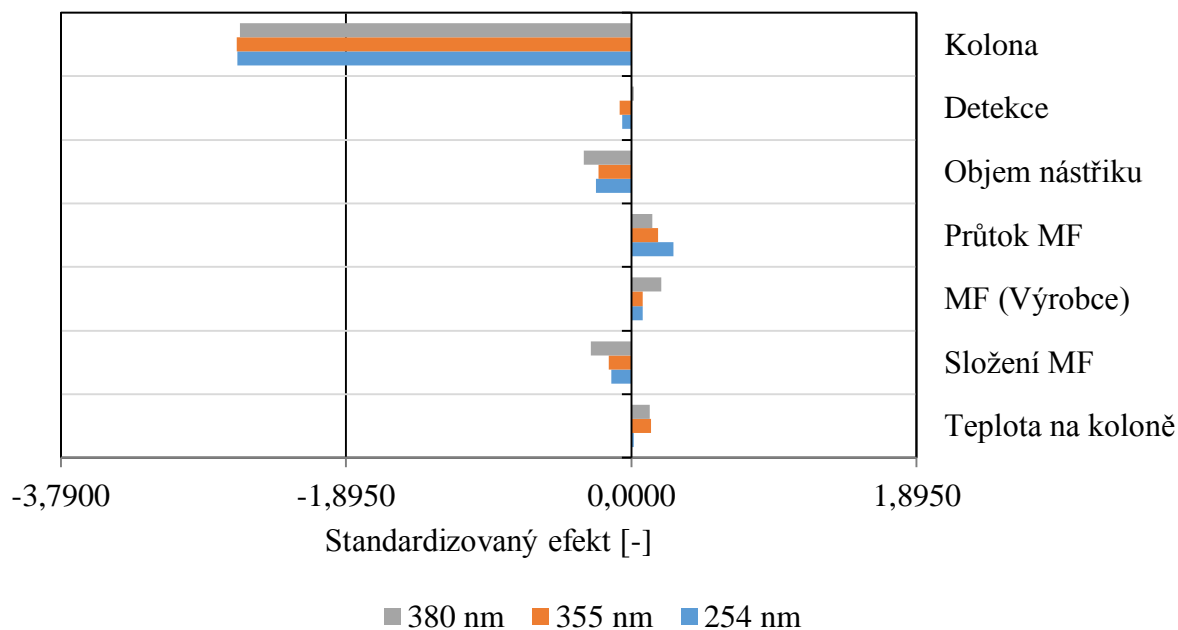


Obrázek 44: Jednotlivé parametry a jejich vliv na tailing faktor oxytetracyklinu

Z obrázku 45 a obrázku 46 je očividné, že na počet teoretických pater má hlavní vliv pouze kolona, ostatní změny parametrů jsou zanedbatelné. Tento výsledek je logický, jelikož počet teoretických pater je vlastností zvolené kolony. Což znamená, že s vlnovou délkou se tato vlastnost nemění, a to se potvrdilo hodnotami standardizovaného efektu, které jsou téměř shodné. Jelikož je hodnota standardizovaného efektu záporná, došlo ke zvýšení počtu teoretických pater při této změně kolony. To znamená, že alternativní kolona XB-C18 byla účinnější při daném měření.

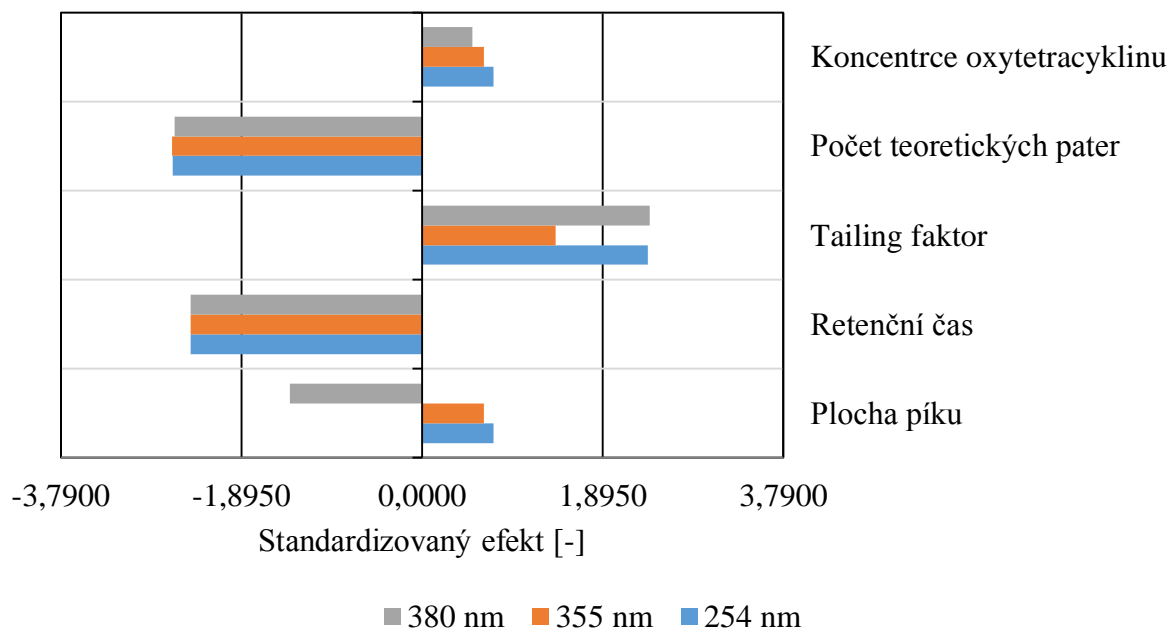


Obrázek 45: Jednotlivé parametry a jejich vliv na počet teoretických pater tetracyklinu

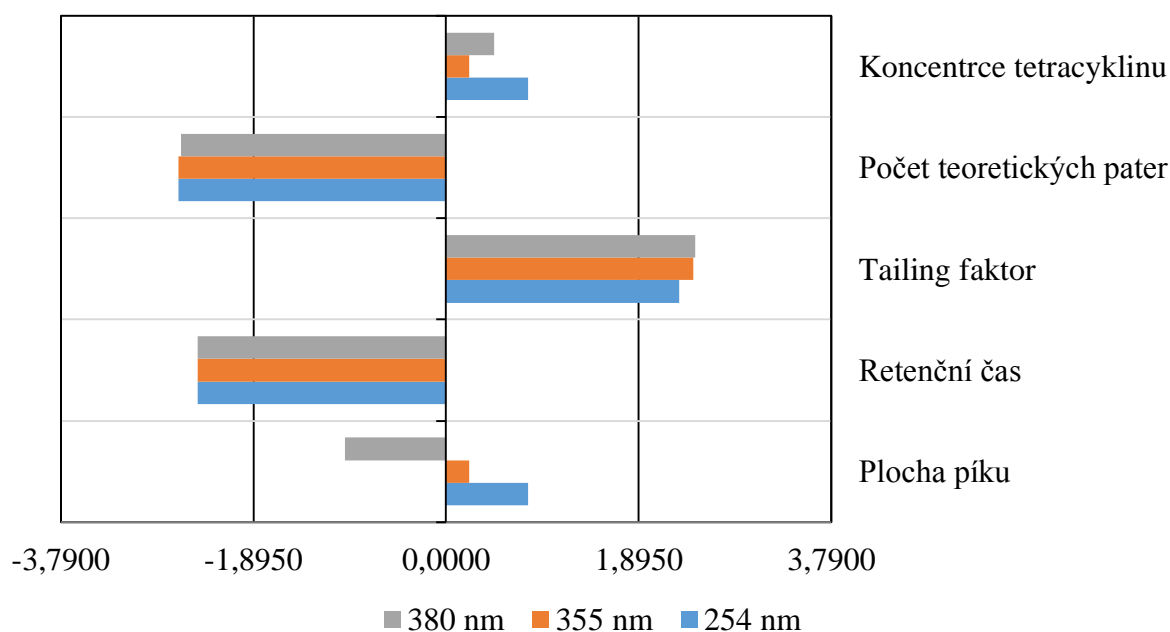


Obrázek 46: Jednotlivé parametry a jejich vliv na počet teoretických pater oxytetracyklinu

Hypotéza, že je metoda robustní při změnách jednotlivých parametrů, byla potvrzena s výjimkou změny kolony. Tento parametr zvyšoval retenční čas a počet teoretických pater, naopak snižoval hodnotu tailing faktoru (Obrázek 47, Obrázek 48). Z výsledků vyplývá, že změna kolony zvýšila přesnost metody, ale zároveň významně zvýšila retenční čas analytů. Zvýšení retenčního času bylo předpokládáno, jelikož výrobce deklaruje zvýšení rychlosti metody o 30 % při využití kolony EVO-C18. Zanedbatelný efekt měla změna kolony na koncentraci standardů a plochu píků, které spolu úzce souvisí. Což je důležité, jelikož nedochází k ovlivnění stanovení koncentrace analytu. Nejmenší efekt na metodu měla změna vlnové délky.



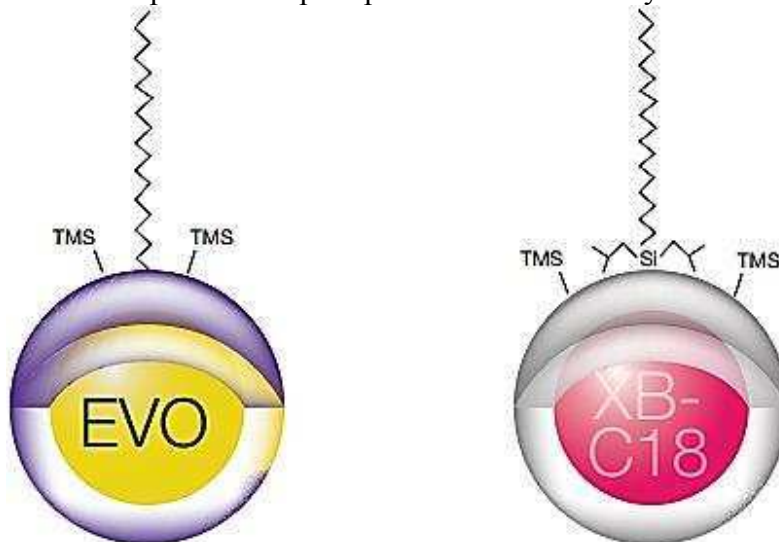
Obrázek 47: Vliv změny parametru kolony na měřené hodnoty oxytetracyklinu



Obrázek 48: Vliv změny parametru kolony na měřené hodnoty tetracyklinu

Kolona, která byla zvolena pro tuto metodu (Kintex 5 μm EVO-C18 150x4,6 mm), byla nástupcem alternativní použité kolony (Kinetex 5 μm XB-C18 150x4,6 mm). Kolona EVO-C18 využívá organokřemičitan ve stacionární fázi, zesíťovaný ethylovými můstky. Takové uspořádání chrání částice před rozpouštěním v alkalickém pH, tím umožňuje kolonu využívat v širokém rozmezí pH (1-12) a zajišťuje její mechanickou odolnost vůči tlakům

využívaných pro systémy UHPLC. Povrch částic je také upraven slabě pozitivním nábojem. Částice stacionární fáze kolony XB-C18 jsou na rozdíl od částic stacionární fáze kolony EVO-C18 porézní po celém povrchu a tím dochází k prodloužení času retence. Jelikož kolona XB-C18 nemá povrchovou úpravu a má volné silanolové skupiny dochází ke zvýšení výskytu vodíkových vazeb a tím zlepšení tvaru píku pro bazické sloučeniny.



Obrázek 49: Struktura náplně kolon použitých pro stanovení oxytetracyklinu a tetracyklinu

5 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo vytvořit robustní metodu pro stanovení tetracyklinových antibiotik v mléce po extrakci technikou DGT pomocí HPLC. Jako cílová antibiotika byly vybrány oxytetracyklin a tetracyklin.

Teoretická část diplomové práce byla zaměřena na poznatky jednotlivých antibiotik, jejich účinku a možnosti vzniku rezistence. Zbytek teoretické práce byl věnován technice HPLC s detekcí pomocí diodového pole (DAD), optimalizaci a validaci metody. Experimentální část byla zaměřena na optimalizaci metody stanovení oxytetracyklinu a tetracyklinu ve směsi. Tato metoda byla následně podrobena validaci.

Optimalizace metody byla zaměřena především na výběr vhodných rozpouštědel, ve kterých by se standardy optimálně rozpustily, a na chromatografickou kolonu, na které by docházelo k separaci. Nedílnou součástí byl výběr vlnové délky pro stanovení tetracyklinu a oxytetracyklinu. Pro metodu byla využita kolona Kinetex EVO C18. Mobilní fáze byla optimalizována pro analýzu v poměru 10 (acetonitril):10 (metanol): 80 (0,01 M kyselina trifluoroctová). Pro analýzu byl zvolen průtok $0,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, nástřík $5 \mu\text{l}$ a teplota termostatu kolony 30°C . Vlnové délky detektoru byly nastaveny na absorpční maxima standardů: 254 nm, 355 nm, 380 nm. Při proměření jednotlivých antibiotik bylo zjištěno, že oxytetracyklin je na koloně zadržován méně než tetracyklin. Tedy oxytetracyklin má nižší retenční čas.

Po vytvoření metody byla tato metoda validována. Počet teoretických pater byl stanoven v rozmezí 19 102–20 534, což znamená, že kolona je dostatečně účinná pro danou metodu. Hodnoty tailing faktoru se blížily k 1, což znamená, že tvar píků se blížil k ideálnímu tvaru. Dostatečná separace standardů byla potvrzena stanovením relativního retenčního faktoru a rozlišení. Pomocí relativní standardní odchylky plochy píku bylo stanoveno, že metoda je dostatečně přesná, protože nejnižší hodnota RSD byla 0,59 % pro oxytetracyklin a vlnovou délku detekce 355 nm a maximální hodnota činila 2,95 % pro tetracyklin a vlnovou délku detekce 254 nm.

Linearita byla stanovena na základně kalibrační křivky složené ze šesti kalibračních bodů. Koeficienty determinace (R^2) se pohybovaly rozsahu 0,9986–0,9993 a tím potvrdily, že metoda je měřena v lineárním rozsahu.

Hodnoty LOD a LOQ byly vypočítány ze směrodatné odchylky a sklonu kalibrační křivky. Limit detekce pro oxytetracyklin byl $0,0246 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ a pro tetracyklin $0,0344 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ a limit kvantifikace byl $0,0821 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ pro oxytetracyklin a $0,1147 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ pro tetracyklin. Tyto hodnoty ukazují, že je metoda citlivější na oxytetracyklin. Nicméně při stanovování antibiotik v reálných vzorcích bude zapotřebí prekoncentrace.

Robustnost je jednou z nezbytných součástí validace. V této práci bylo vybráno sedm parametrů. Pro stanovení robustnosti metody byla využita hladina významnosti $\alpha = 0,05$. Jediné parametry, které měly vyšší hodnotu standardizovaného efektu, než byla hodnota studentova koeficientu, byly změny kolony a vlnové délky detektoru. Významný vliv na robustnost metody neměly změny teploty termostatu kolony, výrobce mobilní fáze, průtoku mobilní fáze, objemu nástriku vzorku a složení mobilní fáze, jelikož hodnota jejich standardního efektu byla $<1,8950$.

Pro detekci oxytetracyklinu i tetracyklinu byla vyhodnocena jako nejvhodnější vlnová délka 355

6 REFERENCE

- [1] GOSIO, B. Contributo all'etiologia della pellagra. Ricerche chimiche e batteriologiche sulle alterazioni del mais. *Giornale della Reale Accademia di Medicina di Torino*, 1893, 61: 484-487.
- [2] BIRKINSHAW, J. H., H. RAISTRICK a D. J. ROSS. Studies in the biochemistry of micro-organisms. 86. The molecular constitution of mycophenolic acid, a metabolic product of *Penicillium brevi-compactum* Dierckx. Part 3. Further observations on the structural formula for mycophenolic acid. *Biochemical Journal*. 1952, 50(5), 630-634. DOI: 10.1042/bj0500630. ISSN 0264-6021
- [3] NICOLAOU, Kyriacos C, Stephan RIGOL a D. J. ROSS. A brief history of antibiotics and select advances in their synthesis. *The Journal of Antibiotics*. 2018, 71(2), 153-184. DOI: 10.1038/ja.2017.62. ISSN 0021-8820.
- [4] ZAFFIRI, Lorenzo, Jared GARDNER a Luis H. TOLEDO-PEREYRA. History of Antibiotics. From Salvarsan to Cephalosporins. *Journal of Investigative Surgery*. 2012, 25(2), 67-77. DOI: 10.3109/08941939.2012.664099. ISSN 0894-1939
- [5] FLEMING, Alexander. On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. influenzae*. *British journal of experimental pathology*. 1929, 10(3), 226-236.
- [6] HOTCHKISS, R. D., R. J DUBOS. Chemical properties of bactericidal substances isolated from cultures of a soil bacillus. *Journal of Biological Chemistry*. 1940, 132, 793-794.
- [7] Antibimicrobial resistance learning site [online]. Michigan State University, 2011 [cit. 2019-10-18]. Dostupné z: <https://amrls.cvm.msu.edu/pharmacology/historical-perspectives/the-golden-age-of-antibacterials>
- [8] DEMAINE, Arnold L. a Richard P. ELANDER. The β -lactam antibiotics: past, present, and future. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1999, 75(1/2), 5-19. DOI: 10.1023/A:1001738823146. ISSN 00036072.
- [9] PAGE, Michael I., Alastair J.J. WOOD, Gerald R. DONOWITZ a Gerald L. MANDELL. The Mechanisms of Reactions of β -Lactam Antibiotics. *Advances in Physical Organic Chemistry Volume 23*. Elsevier, 1987, 1987, 17(4), 165-270. *Advances in Physical Organic Chemistry*. DOI: 10.1016/S0065-3160(08)60204-X. ISBN 9780120335237. ISSN 0001-4842.
- [10] OATES, John A., Alastair J.J. WOOD, Gerald R. DONOWITZ a Gerald L. MANDELL. Beta-Lactam Antibiotics. *New England Journal of Medicine*. 1988, 318(7), 419-426. DOI: 10.1056/NEJM198802183180706. ISSN 0028-4793.
- [11] AGE, Michael I., Alastair J.J. WOOD, Gerald R. DONOWITZ a Gerald L. MANDELL. The mechanisms of reactions of β -lactam antibiotics. *Accounts of Chemical Research*. 2002, 17(4), 144-151. DOI: 10.1021/ar00100a005. ISSN 0001-4842.
- [12] POOLE, K., Alastair J.J. WOOD, Gerald R. DONOWITZ a Gerald L. MANDELL. Resistance to β -lactam antibiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences*. Elsevier, 2004, 1987, 61(17), 165-270. *Advances in Physical Organic Chemistry*. DOI: 10.1007/s00018-004-4060-9. ISBN 9780120335237. ISSN 1420-682X.

- [13] FORGE, Andrew a Jochen SCHACHT. Aminoglycoside Antibiotics. *Audiology and Neuro-Otology*. 2000, 5(1), 3-22. DOI: 10.1159/000013861. ISSN 1421-9700.
- [14] WRIGHT, Gerard D., Albert M. BERGHUIS a Shahriar MOBASHERY. Aminoglycoside Antibiotics. *Resolving the Antibiotic Paradox*. Boston, MA: Springer US, 1998, 5(1), 27-69. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. DOI: 10.1007/978-1-4615-4897-3_4. ISBN 978-1-4613-7220-2. ISSN 1421-9700.
- [15] DAVIES, Julian, Gerard D. WRIGHT a Shahriar MOBASHERY. Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. *Trends in Microbiology*. Boston, MA: Springer US, 1997, 1998, 5(6), 27-69. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. DOI: 10.1016/S0966-842X(97)01033-0. ISBN 978-1-4613-7220-2. ISSN 0966842X.
- [16] ZHANEL, George G., Maria DUECK, Daryl J. HOBAN, Lavern M. VERCAIGNE, John M. EMBIL, Alfred S. GIN a James A. KARLOWSKY. Review of Macrolides and Ketolides. *Drugs*. 2001, 61(4), 443-498. DOI: 10.2165/00003495-200161040-00003. ISSN 0012-6667.
- [17] GAYNOR, Marne a Alexander MANKIN. Macrolide Antibiotics: Binding Site, Mechanism of Action, Resistance. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2003, 3(9), 949-960. DOI: 10.2174/1568026033452159. ISSN 15680266.
- [18] MAZZEI, T., E. MINI, A. NOVELLI, P. PERITI, John M. EMBIL, Alfred S. GIN a James A. KARLOWSKY. Chemistry and mode of action of macrolides. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1993, 31(suppl C), 1-9. DOI: 10.1093/jac/31.suppl_C.1. ISSN 0305-7453.
- [19] KANNAN, Krishna, Nora VÁZQUEZ-LASLOP, Alexander S. MANKIN, P. PERITI, John M. EMBIL, Alfred S. GIN a James A. KARLOWSKY. Selective Protein Synthesis by Ribosomes with a Drug-Obstructed Exit Tunnel. *Cell*. 2012, 151(3), 508-520. DOI: 10.1016/j.cell.2012.09.018. ISSN 00928674.
- [20] NAKAJIMA, Yoshinori. Mechanisms of bacterial resistance to macrolide antibiotics. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 1999, 5(2), 61-74. DOI: 10.1007/s101560050011. ISSN 1341321X.
- [21] WEISBLUM, Bernard. Macrolide resistance. *Drug Resistance Updates*. 1998, 1(1), 29-41. DOI: 10.1016/S1368-7646(98)80212-4. ISSN 13687646.
- [22] MORAR, Mariya, Kirandeep BHULLAR, Donald W. HUGHES, Murray JUNOP a Gerard D. WRIGHT. Structure and Mechanism of the Lincosamide Antibiotic Adenylyltransferase LinB. *Structure*. 2009, 17(12), 1649-1659. DOI: 10.1016/j.str.2009.10.013. ISSN 09692126.
- [23] REZANKA, Tomas, Jaroslav SPIZEK a Karel SIGLER. Medicinal Use of Lincosamides and Microbial Resistance to Them. *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry*. 2007, 6(2), 133-144. DOI: 10.2174/187152107780361670. ISSN 18715214.
- [24] KATZ, Edward. Biosynthesis of polypeptide antibiotics. *Pure and Applied Chemistry*. 1971, 28(4), 551-570. DOI: 10.1351/pac197128040551. ISSN 1365-3075.
- [25] HANCOCK, Robert E. W. a Daniel S. CHAPPLE. Peptide Antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1999, 43(6), 1317-1323. DOI: 10.1128/AAC.43.6.1317. ISSN 0066-4804.

- [26] DUGGAR, B. M. AUREOMYCIN: A PRODUCT OF THE CONTINUING SEARCH FOR NEW ANTIBIOTICS. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1948, 51(2), 177-181. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1948.tb27262.x. ISSN 00778923.
- [27] GROSSMAN, Trudy H. Tetracycline Antibiotics and Resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2016, 6(4). DOI: 10.1101/cshperspect.a025387. ISSN 2157-1422.
- [28] MICHALOVA, E., P. NOVOTNA a J. SCHLEGELOVA. Tetracyclines in veterinary medicine and bacterial resistance to them. *Veterinární Medicína*. 2012, 49(3), 79-100. DOI: 10.17221/5681-VETMED. ISSN 03758427.
- [29] DEL CASTILLO, Jérôme R.E. Tetracyclines. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. Hoboken, NJ, 2013, 2013-08-16, 5, 257-268. DOI: 10.1002/9781118675014.ch15. ISBN 9781118675014.
- [30] NGUYEN, Fabian, Agata L. STAROSTA, Stefan ARENZ, Daniel SOHMEN, Alexandra DÖNHÖFER a Daniel N. WILSON. Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. *Biological Chemistry*. 2014, 395(5). DOI: 10.1515/hsz-2013-0292. ISSN 1437-4315.
- [31] TEO, J. W. P., T. M. C. TAN a C. L. POH. Genetic Determinants of Tetracycline Resistance in *Vibrio harveyi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2002, 46(4), 1038-1045. DOI: 10.1128/AAC.46.4.1038-1045.2002. ISSN 0066-4804.
- [32] ZAKERI, Bijan a Gerard D. WRIGHT. Chemical biology of tetracycline antibiotics This paper is one of a selection of papers published in this Special Issue, entitled CSBMCB — Systems and Chemical Biology, and has undergone the Journal's usual peer review process. *Biochemistry and Cell Biology*. 2008, 86(2), 124-136. DOI: 10.1139/O08-002. ISSN 0829-8211.
- [33] VOLKERS, Gesa, Gottfried J. PALM, Manfred S. WEISS, Gerard D. WRIGHT a Winfried HINRICHS. Structural basis for a new tetracycline resistance mechanism relying on the TetX monooxygenase. *FEBS Letters*. 2011, 585(7), 1061-1066. DOI: 10.1016/j.febslet.2011.03.012. ISSN 00145793.
- [34] HYNIE, Sixtus. *Farmakologie v kostce*. 2., přeprac. vyd. V Praze: Triton, 2001. ISBN 80-725-4181-1.
- [35] WRIGHT, A.L. a G.B. COLVER. Tetracyclines-how safe are they? *Clinical and Experimental Dermatology*. 1988, 13(2), 57-61. DOI: 10.1111/j.1365-2230.1988.tb00657.x. ISSN 0307-6938.
- [36] CHOPRA, I. a M. ROBERTS. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2001, 65(2), 232-260. DOI: 10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001. ISSN 1092-2172.
- [37] POKLUDOVÁ, L., L. KOUTECKÁ, D. DORN, J. WOJTYLOVÁ, A. HERA a J. BUREŠ. SPOTŘEBA ANTIMIKROBIK VE VETERINÁRNÍ MEDICÍNĚ V ČR.: DETAILNÍ SROVNÁNÍ SPOTŘEB ANTIMIKROBIK 2010 - 2015. Brno: Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv, 2018.

- [38] ELIOT, M. OIE Annual report on the use of antimicrobial agents in animals: Better understanding of the global situation. Paris: World Organisation for Animal Health (OIE), 2017.
- [39] MICHALOVA, E., P. M. PNOVOTNA a J. SCHLEGELOVA. Tetracyclines in veterinary medicine and bacterial resistance to them. *Veterinární Medicína*. 2012, 49(No. 3), 79-100. DOI: 10.17221/5681-VETMED. ISSN 03758427.
- [40] CHOPRA, I., P. M. HAWKEY a M. HINTON. Tetracyclines, molecular and clinical aspects. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1992, 29(3), 245-277. DOI: 10.1093/jac/29.3.245. ISSN 0305-7453.
- [41] WELLENBERG, G.J, W.H.M VAN DER POEL a J.T VAN OIRSCHOT. Viral infections and bovine mastitis: a review. *Veterinary Microbiology*. 2002, 88(1), 27-45. DOI: 10.1016/S0378-1135(02)00098-6. ISSN 03781135.
- [42] UANG, Ying, Haoyu JIA, Kazuhiko MIYANAGA a Yasunori TANJI. Effect of milk on antibacterial activity of tetracycline against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2009, 84(1). DOI: 10.1007/s00253-009-2008-6. ISSN 0175-7598.
- [43] KHANIKI, Gh. R. Jahed. Chemical Contaminants in Milk and Public Health Concerns: A Review. *International Journal of Dairy Science*. 2007, 2(2), 104-115. DOI: 10.3923/ijds.2007.104.115. ISSN 18119743.
- [44] Liquid chromatography (LC). IUPAC Compendium of Chemical Terminology. Research Triangle Park, NC: IUPAC, 2009. DOI: 10.1351/goldbook.L03578. ISBN 0-9678550-9-8.
- [45] AKRAM, N. MD. A Review on High Performance Liquid Chromatography (HPLC). *International Journal for Research in Applied Science and Engineering Technology*. 2018, 6(2), 488-492. DOI: 10.22214/ijraset.2018.2098. ISSN 23219653.
- [46] HAMMANA, M,. A Review on High Performance Liquid Chromatography (HPLC). *Research & Reviews: Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2016, 5(2), 22-28. ISSN 2320-0812.
- [47] CHROMacademy: The worlds largest e-Learning website for analytical scientists [online]. [cit. 2018-03-27]. Dostupné z: www.chromacademy.com
- [48] ROWLEY, Thomas E. High-performance liquid chromatography. In: *Purification and Characterization of Secondary Metabolites*. Elsevier, 2020, 2020, s. 49-58. DOI: 10.1016/B978-0-12-813942-4.00005-X. ISBN 9780128139424.
- [49] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [50] LINDSAY, S. *High Performance Liquid Chromatography*. Second edition. London: John Wiley, 1997. ISBN 0-471-93115-2.
- [51] MEYER, Veronika R. *Practical high-performance liquid chromatography*. 3rd ed. Chichester: John Wiley, 1999. ISBN 04-719-8373-X.
- [52] FANALI, S., P. R. HADDA, C. POLE a M. L. RIEKKOLA. *Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation*. 2nd Edition. Elsevier, 2017, 808 s. ISBN 9780128053935.

- [53] VREEKER, Gerda C. M. a Manfred WUHRER. Reversed-phase separation methods for glycan analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2017, 409(2), 359-378. DOI: 10.1007/s00216-016-0073-0. ISSN 1618-2642.
- [54] SWARTZ, Michael. HPLC DETECTORS: A BRIEF REVIEW. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*. 2010, 33(9-12), 1130-1150. DOI: 10.1080/10826076.2010.484356. ISSN 1082-6076.
- [55] SWADESH, J. K. HPLC: Practical and Industrial Applications. Second edition. United States of America: CRC presss, 2001. ISBN 0-8497-0003-7.
- [56] DOUŠKA, Michal. HPLC.cz. HPLC.CZ [online]. 1199-2020 [cit. 2020-02-06]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz/>
- [57] RANJIT, Singh. HPLC method development and validation- an overview. *Journal of Pharmaceutical Education and Research*. Ludhiana, 2013, 4(1), 26-33. ISSN 0976-8238.
- [58] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. Moderní HPLC separace v teorii a praxi. II. Lucie Nováková : Michal Douša, 2013, 235 s. : il. ISBN 978-80-260-4244-0.
- [59] BADAL, Milan, Josef K. FUKSA, Jiří MEDEK, Ivan KORUNA, František MOKRÝ, Zbyněk PLZÁK a Miloslav SUCHÁNEK. Kvalimetrie: 10. Jakost v analytické laboratoři 2000. Praha: EURACHEM - ČR, 2000. ISBN 80-901868-8-2.
- [60] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. Moderní HPLC separace v teorii a praxi. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [61] BARNETT, Kimber L., Brent HARRINGTON a Timothy W. GRAUL. Validation of liquid chromatographic methods. *Liquid Chromatography*. Elsevier, 2017, 2017, , 533-552. DOI: 10.1016/B978-0-12-805393-5.00022-1. ISBN 9780128053935.
- [62] RAVISANKAR, Panchumarthy, Ch. Naga NAVYA, D. PRAVALLIKA a D. NAVYA SRI. A Review on Step-by-Step Analytical Method Validation. *IOSR Journal Of Pharmacy*. 2015, 5(10), 07-19. ISSN 2319-4219.
- [63] KRULL, Ira S. a Michael SWARTZ. Analytical Method Development and Validation for the Academic Researcher. *Analytical Letters*. 1999, 32(6), 1067-1080. DOI: 10.1080/00032719908542878. ISSN 0003-2719.
- [64] MEYER, Veronika R. Practical high-performance liquid chromatography. 3rd ed. Chichester: John Wiley, 1999. ISBN 04-719-8373-X.
- [65] LOPEZ, Pedro, Ernesto BUFFONI, Fabio PEREIRA a Jose Luis VILCHEZ QUERO. Analytical Method Validation. Wide Spectra of Quality Control. *InTech*, 2011, 2011-07-07. DOI: 10.5772/21187. ISBN 978-953-307-683-6.
- [66] UWONO, Mochammad a Gunawan INDRAYANTO. Validation of Chromatographic Methods of Analysis. Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology Volume 32. Elsevier, 2005, 2005, , 243-259. Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology. DOI: 10.1016/S0099-5428(05)32009-0. ISBN 9780122608322.
- [67] FERREIRA, Sergio L.C., Adriana O. CAIRES, Thaise da S. BORGES, Ariana M.D.S. LIMA, Laiana O.B. SILVA a Walter N.L. DOS SANTOS. Robustness evaluation in analytical methods optimized using experimental designs. *Microchemical Journal*. 2017, 131, 163-169. DOI: 10.1016/j.microc.2016.12.004. ISSN 0026265X.

- [68] KARAGEORGOU, Eftichia a Victoria SAMANIDOU. Youden test application in robustness assays during method validation. *Journal of Chromatography A*. 2014, 1353, 131-139. DOI: 10.1016/j.chroma.2014.01.050. ISSN 00219673.
- [69] PubChem: National Center for Biotechnology Information [online]. 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD, 20894 USA [cit. 2020-04-12]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
- [70] BISWAS, A. K., G. S. RAO, N. KONDAIAH, A. S. R. ANJANEYULU, S. K. MENDIRATTA, R. PRASAD a J. K. MALIK. A Simple Multi-residue Method for Determination of Oxytetracycline, Tetracycline and Chlortetracycline in Export Buffalo Meat by HPLC-Photodiode Array Detector. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2007, 15(3), 278-284.
- [71] RITZ, J a Y ZUO. Simultaneous determination of tetracycline, oxytetracycline, and 4-epitetracycline in milk by high-performance liquid chromatography. *Food Chemistry*. 2007, 105(3), 1297-1301. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.03.047. ISSN 03088146.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

RP HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s obrácenými (reverzními) fázemi
EU	Evropská unie
PBP	protein vázající penicilin
ATP	adenosin trifosfát
RNA	Ribonukleová kyselina
t-RNA	transferová ribonukleová kyselina
r-RNA	ribozomální ribonukleová kyselina
MFS	membránový transportní proteiny
GTP	guanosin trifosfát
ČR	Česká republika
OIE	World organisation of Animal Health
MLR	maximální limit reziduí
PEEK	polyetherketonová vlákna
UV-VIS	Ultrafialovo-viditelná spektroskopie
MF	Mobilní fáze
SF	Stacionární fáze
RSD	relativní směrodatná odchylka
ICH	Mezinárodní konference o harmonizaci
ISO	Mezinárodní organizace pro normalizaci
DAD	detektor s diodovým polem
CAS	Registrační číslo (Chemical Abstract Service)
DGT	Technika difúzního gradientu v tenkém filmu
UHPLC	Ultra-high pressure liquid chromatography